

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 571**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**C07K 16/44** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2005 E 05742378 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1745077**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal AS104 y derivado del mismo que se une específicamente a un hidrato de carbono de sialiltetraosilo como agente terapéutico anti-tumoral potencial**

30 Prioridad:

**12.05.2004 GB 0410627**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.04.2013**

73 Titular/es:

**CEPHALON AUSTRALIA PTY LTD (100.0%)  
LEVEL 2, 37 EPPING ROAD  
MACQUARIE PARK NSW 2113, AU**

72 Inventor/es:

**DURRANT, LINDA, GILLIAN y  
PARSONS, TINA**

74 Agente/Representante:

**DE JUSTO BAILEY, Mario**

**ES 2 400 571 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpo monoclonal AS104 y derivado del mismo que se une específicamente a un hidrato de carbono de sialiltetraosilo como agente terapéutico anti-tumoral potencial

5 La presente invención se refiere a anticuerpos y sus fragmentos, que se unen a un epitopo relevante para el cáncer y la endometriosis. Estos anticuerpos y fragmentos son útiles para el diagnóstico y tratamiento de tumores.

10 Son conocidos anticuerpos que se unen a gangliósidos GM2, GD3 y GM3, pero no ha sido anteriormente descrito un anticuerpo que se una a sialiltetraosilceramida, pero que no se una a GM1, GD1a, GT1b o antígenos de Lewis de sialilo. Un anticuerpo monoclonal de ratón (mab), conocido en la presente memoria descriptiva como "SC104", fue elevado a una inmunización secuencial con 4 líneas celulares de cáncer colorrectal y se une a un 71% de los tumores colorrectales. El SC104 es específico para un hidrato de carbono de sialiltetraosilo, que puede estar presente en una cadena principal de lípido (ceramida) o proteína, y reconoce tumores de esófago, colorrectal, 15 gástricos, de mamas, parotídeo y endometrial. El SC104 es inusual ya que es un anticuerpo de IgG1. Una de las características inmunológicas de los antígenos de hidratos de carbono es que habitualmente provocan una respuesta independiente de células T, dando lugar a la producción de un anticuerpo de IgM. El SC104 se mostró mediante placas de HPLTC de inmuno-tinción de extractos lípidos a partir de la línea celular colorrectal C170, que se unía a sialiltetraosil-ceramida. El SC104 se mostró también que se unía a un resto de proteína que tiene el hidrato de carbono de sialiltetraosilo. El reconocimiento del tejido normal fue mínimo y restringido a una tinción moderada del intestino grueso, glándula salivar, intestino delgado, timo, amígdalas y cuello uterino. La presente invención encontró también que, sorprendentemente, el anticuerpo inducía la muerte celular.

20 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo que comprende los siguientes dominios:

25 GYSITSGYSWH (aminoácidos 44 a 54 de la figura 1a) o SGYSWH (aminoácidos 49 a 54 de la figura 1a),

30 HIHFSGRPTYNPSLSS (aminoácidos 69 a 84 de la figura 1a),

KGKGSDDGLNY (aminoácidos 117 a 127 de la figura 1a),

SASSLSYIH (aminoácidos 46 a 55 de la figura 1c),

35 DTSNLAS (aminoácidos 71 a 77 de la figura 1c), y

FQGSEYPLT (aminoácidos 110 a 118 de la figura 1c),

40 en que la unión del anticuerpo a una célula es capaz de inducir la muerte celular sin necesidad de células efectoras inmunes.

Un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos:

45 DVQLQESGPDLVKPSQSLSTCTVTGYSITSGYSWHWVRQFPGNKMEWMGHIHFSGRPTYNPSLSSRISITRDTSKN QFLLQLVKVTEDTSTYFCARKGKGSDDGLNYWGQGISVTVSSAKTTPPVYPLVPGSL (aminoácidos 19 a 138 de la figura 1a), o la secuencia de aminoácidos:

50 MRVILLCLFTAFPGILSDVQLQESGPDLVKPSQSLSTCTVTGYSITSGYSWHWVRQFPGNKMEWMGHIHFSGRPT YNPSLSSRISITRDTSKNQFLLQLKFVTEDTSTYFCARKGKGSDDGLNYWGQGISVTVSSAKTTPPVYPLVPGSL (aminoácidos 1 a 138 de la figura 1a).

El o cada dominio de unión puede ser portado por un marco de anticuerpos humanos. Por ejemplo, una o más regiones de unión pueden sustituir a las CDR de un anticuerpo humano completo o de su región variable.

55 Un anticuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos:

60 ENVLTQSPVIMSASPGEKVTMTCSASSLSYTHWYQKSRTPKLIWYDTSNLASGSGVGRFSGSGNSYSLTISS MEAEDVATYYCQGSEYPLTFGGGKLEMRADAAPTIVSIFPPSSKLGK (aminoácidos 23 a 128 de la figura 1c) o la secuencia de aminoácidos

MDSQVQIFSLLISASVIMSRGENVLTQSPVIMSASPGEKVTMTCSASSLSYIHWYQKSRTPKLIWYDTSNLASGV PGRFSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYCFQGSEYPLTFGGGKLEMRADAAPTIVSIFPPSSKLGK (aminoácidos 1 a 128 de la figura 1c)

65 Los anticuerpos de la invención pueden portar un marcador detectable o funcional.

También se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo de la invención y métodos para preparar anticuerpos de la invención que comprenden expresar dichos ácidos nucleicos bajo condiciones para llevar a cabo la expresión de dicho anticuerpo y recuperar el anticuerpo.

5 La invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y un excipiente, diluyente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un agente activo seleccionado entre el grupo que consiste en doxorubicina, paclitaxel, 5-fluorouracilo, irinotecano y cisplatino.

10 Los anticuerpos y composiciones farmacéuticas según la invención pueden ser usados en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, como un método de tratamiento de un tumor en un paciente (preferentemente humano), que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. La invención proporciona también un anticuerpo o composición farmacéutica de la presente invención para ser usado en medicina, particularmente para tratar un tumor, así como el uso de un anticuerpo o composición farmacéutica de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el diagnóstico o tratamiento de un tumor.

También se proporciona el antígeno al que se unen los anticuerpos de la presente invención. Puede ser proporcionado un hidrato de carbono de sialiltetraosilo que es capaz de ser unido, preferentemente de forma específica, por un anticuerpo de la presente invención. El hidrato de carbono de sialiltetraosilo puede ser proporcionado en forma aislada y puede ser usado en una selección para desarrollar miembros de unión específicos para el mismo. Por ejemplo, puede ser seleccionada una biblioteca de compuestos para los miembros de la biblioteca que se unen específicamente al hidrato de carbono de sialiltetraosilo.

20 El hidrato de carbono de sialiltetraosilo puede estar en una cadena principal lípida (es decir, una sialiltetraosilceramida) o en una cadena principal de proteína. Cuando está en una cadena principal de proteína, puede tener un peso molecular de aproximadamente 50-75 kDa, según se determina mediante SDS-PAGE.

Estos y otros aspectos de la invención se describen más en detalle a continuación.

30 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "tratamiento" incluye cualquier régimen que pueda aprovechar un ser humano o animal no humano, preferentemente un mamífero. El tratamiento puede ser con respecto a un estado existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo).

35 Como se usa en la presente memoria descriptiva, un "tumor" es un crecimiento anormal de un tejido. Puede ser localizado (benigno) o invadir los tejidos cercanos (maligno) o tejidos distantes (metastático). Los tumores incluyen crecimientos neoplásicos que provocan cáncer e incluyen tumores de esófago, colorrectal, gástrico, de mamas y endometrial, así como tejidos cancerosos o líneas celulares que incluyen, pero sin limitación, células leucémicas. Como se usa en la presente memoria descriptiva, "tumor" incluye también dentro de su alcance la endometriosis.

40 El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno, ya sea producido de forma natural o parcial o completamente sintética. El término abarca también cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que es un dominio de unión a anticuerpo u homólogo del mismo. Estos pueden ser derivados de fuentes naturales o pueden ser producidos de forma parcial o completamente sintética. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulinas (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) y sus subclases isotípicas; fragmentos que comprenden un dominio de unión a antígeno como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Un anticuerpo monoclonal puede ser denominado en la presente memoria descriptiva "mab".

50 Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de DNA recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retengan la especificidad del anticuerpo original. Estas técnicas pueden incluir DNA que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes complementarias (CDR) de un anticuerpo para las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de marcos, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Un hibridoma u otra célula que produzca un anticuerpo puede ser sometido a mutación genética u otros cambios, que pueden alterar o no la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

60 Como los anticuerpos pueden ser modificados en un cierto número de formas, el término "anticuerpo" se debe interpretar que abarca cualquier miembro o sustancia de unión específica que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, este término abarca fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes y homólogos funcionales de anticuerpos, anticuerpos humanizados, que incluyen cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o parcial o completamente sintético. Por lo tanto, están incluidas las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionada a otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo modificado que tenga las

regiones variables de un anticuerpo no humano, por ejemplo, de murino, y la región constante de un anticuerpo humano. Los métodos para preparar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5225539.

5 Se ha mostrado que fragmentos de un anticuerpo completo puede realizar la función de antígenos de unión. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo único; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341:544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena única (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL está unidos por un conector péptido que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., PNAS USA 85:5879-5883 (1988)); (viii) dímeros Fv de cadena única biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica (documento WO94/13804; P. Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)).

Los diacuerpos son multimeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando unidos los dos dominios (por ejemplo, mediante un conector péptido) pero siendo incapaces de asociarse uno a otro para formar un sitio de unión a antígeno: los sitios de unión a antígenos se forman mediante la asociación del primer dominio de un polipéptido en el multímero con el segundo dominio de otro polipéptido en el multímero (documento WO 94/13804).

25 Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden ser fabricados en una diversidad de formas (Hollinger & Winter, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449 (1993)), por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los anticuerpos biespecíficos anteriormente mencionados. Puede ser preferible usar dímeros de scFv o diacuerpos en lugar de anticuerpos completos. Los diacuerpos y scFv pueden ser construidos sin una región Fc, usando solamente dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de una reacción anti-idiotípica. Otras formas de anticuerpos biespecíficos incluyen la cadena única "Janusins" descrita en la publicación Traunecker et al., EMBO Journal 10:3655-3659 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos, contrariamente a los anticuerpos completos biespecíficos, pueden ser útiles también porque pueden ser fácilmente construidos y expresados en *E. coli*. Los diacuerpos (y cualesquiera otros polipéptidos como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión apropiadas pueden ser fácilmente seleccionados usando muestreo de fagos (documento WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo va a ser mantenido constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces puede ser preparada una biblioteca en la que el otro brazo es variado y un anticuerpo de especificidad seleccionada apropiada.

40 Un "dominio de unión a antígeno" es la parte de un anticuerpo que comprende el área a la que se une específicamente y es complementario a parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solo se puede unir a una parte particular del antígeno, parte que se denomina un epitopo. Un dominio de unión a antígeno puede estar provisto con uno o más dominios variables de anticuerpos. Un dominio de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada del anticuerpo (VH).

"Específico" es generalmente usado para hacer referencia a la situación en la que un miembro de un par de unión específica no muestra ninguna unión significativa a moléculas distintas de su asociado(s) de unión específica y, por ejemplo, tiene menos de aproximadamente 30%, preferentemente 20%, 10% o 1% de reactividad cruzada con cualquier otra molécula. El término es aplicable también cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epitopo particular que es portado por un cierto número de antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específica que porta el dominio de unión al antígeno será capaz de unirse a diversos antígenos que portan el epitopo.

55 "Aislado" hace referencia al estado en el que los miembros de unión específica de la invención o ácido nucleico que codifica estos miembros de unión que codifican estos miembros de unión serán preferentemente exentos a la presente invención. Los miembros y el ácido nucleico estarán generalmente exentos o sustancialmente exentos de material con el que estén naturalmente asociados como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con el que se encuentren en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando esta preparación es mediante tecnología de DNA recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros de unión específica y ácido nucleico pueden ser formulados con diluyentes o adyuvantes y todavía para fines prácticos ser aislados, por ejemplo, los miembros normalmente serán mezclados con gelatina u otros vehículos si se usan para revestir placas de microtitulación para ser usadas en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando son usados en diagnóstico o terapia. Los miembros de unión específica pueden ser glicosilados, de forma natural o mediante sistemas de células eucarióticas heterólogas, o pueden estar sin glicosilar (por ejemplo, si se producen mediante expresión en una célula procariótica).

Mediante “sustancialmente como se expone” se quiere indicar que las regiones CDR de la invención serán iguales o altamente homólogas para las regiones especificadas de las figuras 1a y 1c. Mediante “altamente homólogas” está previsto que se pueden hacer de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, 2 ó 1 sustituciones en las CDR.

La invención incluye también dentro de su alcance anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la figura 1a o 1c, polinucleótidos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en la figura 1a o 1c y secuencias que tienen una identidad sustancial a las mismas, por ejemplo, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad a las mismas. El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos se determina generalmente alineando las secuencias para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden ser introducidas separaciones en la primera secuencia para una mejor alineación con la segunda secuencia) y comparando los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones. La “mejor alineación” es una lineación de dos secuencias que da lugar al mayor porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad se determina comparando el número de residuos de aminoácidos o nucleótidos iguales en las secuencias (es decir, % identidad = número de posiciones iguales/número de posiciones totales x 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede realizar usando un algoritmo matemático conocido por los expertos en la técnica. Un ejemplo de un algoritmo matemático para comparar dos secuencias es el algoritmo de and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. The NBLAST y los programas XBLAST de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 han incorporado este algoritmo. Las búsquedas de nucleótidos de BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas de la invención. Para obtener alineaciones separadas para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe por Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterativa que detecta las relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden ser usados por defecto los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo de algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers and Miller, CABIOS (1989). El programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG, ha incorporado este algoritmo. Otros algoritmos para el análisis de secuencias conocidos en la técnica incluyen ADVANCE y ADAM, como se describe por Torellis and Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10 :3-5; y FASTA descrito por Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8. Con FASTA, ktup es una opción de control que ajusta la sensibilidad y velocidad de la búsqueda.

Los anticuerpos de la presente invención son capaces de unirse a hidratos de carbono de sialiltetraosilo, que puede ser también una sialiltetraosil-ceramida o puede ser un resto de proteína. Las regiones CDR son portadas en una estructura que permite la unión de estas regiones a un hidrato de carbono de sialiltetraosilo.

La estructura para portar las CDR de la invención serán generalmente de una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpos o una parte sustancial de la misma en la que las regiones CDR está colocadas en ubicaciones correspondientes a regiones CDR de dominios variables de anticuerpos VH y VL que se producen de forma natural codificados mediante genes de inmunoglobulina reagrupados. Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden ser determinados mediante referencia a Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition, US Department of Health and Human Services, (1987) y sus actualizaciones, actualmente disponibles en internet (<http://immuno.bme.nwu.edu>).

La secuencia de aminoácidos sustancialmente como se expone en los residuos 117 a 127 de la figura 1a puede ser portada como la CDR3 en un dominio variable de cadena pesada humano o una parte sustancial del mismo, y la secuencia de aminoácidos sustancialmente como se expone en los residuos 110 a 118 de la figura 1c puede ser portada como la CDR3 en un dominio variable de cadena ligera humano o una parte sustancial del mismo.

Los dominios variables pueden ser derivados de cualquier línea germinal o dominio variable humano reagrupado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en secuencias de consenso de dominios variables humanos conocidos. Las secuencias derivadas de CD4 de la invención pueden ser introducidas en un repertorio de dominios variables que carezcan de regiones de CDR3, usando la tecnología de DNA recombinante.

Por ejemplo, Marks et al (Bio/Technology 10:779-783 (1992)), describen métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se usan cebadores de consenso dirigidos o adyacentes al extremo 5' del área del dominio variable conjuntamente con cebadores de consenso para la tercera región marco de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables de VH que carecen de una CDR3. Merks et al. describen adicionalmente el mono en que este repertorio puede ser combinado con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden ser reordenadas con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos

reordenados son combinados con un dominio VL o VH afín para proporcionar miembros de unión específicos de la invención. El repertorio puede ser seguidamente mostrado en un sistema hospedante adecuado como el sistema de muestreo de fagos del documento WO 92/01047, de forma que se puedan seleccionar miembros de unión específica adecuados. Un repertorio puede consistir en aproximadamente por encima de  $10^4$  miembros individuales, por ejemplo, de  $10^6$  a  $18^8$  ó  $10^{10}$  miembros.

Se describen también técnicas análogas de reordenación o combinatoriales por Stemmer (Nature 370:389-391 (1994)), que describe la técnica en relación con un gen de  $\beta$ -lactamasa, pero observa que la aproximación puede ser usada para la generación de anticuerpos.

Una alternativa adicional es generar nuevas regiones VH o VL que porten las secuencias derivadas de CDR3 de la invención usando mutagénesis al azar de, por ejemplo, los genes SC104 VH o VL para generar mutaciones en el dominio variable completo. Esta técnica es descrita por Gram et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580 (1992)), que usaron PCR propensa a errores.

Otro método que puede ser usado es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes VH o VL. Estas técnicas se exponen por Barbas et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)) and Schier et al (J. Mol. Biol. 263:551-567 (1996)).

Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá generalmente al menos tres regiones CDR, junto con sus regiones marco intervinientes. La parte puede incluir también al menos aproximadamente 50% de una o las des de la primera y cuarta regiones marco, siendo el 50% la C-terminal 50% de la primera región marco y 0% N-terminal de la cuarta región marco. Los residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser los que no están normalmente asociados con regiones de dominios variables que se producen de forma natural. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión específica de la presente invención preparados mediante técnicas de DNA recombinante pueden dar lugar a la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por conectores introducidos para facilitar las etapas de clonación o manipulación, incluida la introducción de conectores para unir dominios variables de la invención a secuencias de proteínas adicionales que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteínas, como se expone más en detalle con posterioridad.

Una realización de la invención proporciona anticuerpos que comprenden un par de dominios de unión basados en las secuencias de aminoácidos de las regiones VL y VH sustancialmente como se expone en las figuras 1a y 1c, es decir, los aminoácidos 19 a 138 de la figura 1a y los aminoácidos 23 a 128 de la figura 1c. Los dominios de unión únicos basados en estas secuencias forman aspectos adicionales de la invención. En el caso de los dominios de unión basados en las secuencias de aminoácidos para la región VH sustancialmente expuesta en la figura 1a, estos dominios de unión pueden ser usados como agentes dirigidos a diana, ya que es conocido que los dominios VH de inmunoglobulina son capaces de unirse a antígenos dianas de una manera específica.

En el caso de dominios de unión específicos de cadena única, estos dominios pueden ser usados para seleccionar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión específica de dos dominios que tiene propiedades *in vivo* tan buenas o iguales a las del anticuerpo SC104 descrito en la presente memoria descriptiva.

Esto se puede conseguir mediante métodos de selección de muestreo de fagos usando la denominada aproximación combinatorial dual jerárquica como se describe en el documento WO 92/01047, en la que una colonia individual que contiene un clon H o L es usada para infectar una biblioteca completa de clones que codifica la otra cadena (L o H) y el miembro de unión específica de dos cadenas resultante se selecciona de conformidad con técnicas de muestro de fagos como las descritas en esa referencia. Esta técnica es descrita también por Marks et al, *ibid*.

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender adicionalmente regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos basados en la región VL mostrada en la figura 1c pueden estar unidos en su extremo C-terminal a dominios constantes de cadena libera de anticuerpos que incluyen las cadenas  $C_{\kappa}$  o  $C_{\lambda}$  humanas. Análogamente, los anticuerpos basados en la región VH mostrada en la figura 1a o 1b pueden estar unidos en su extremo C-terminal a la totalidad o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualesquiera las subclases de los isotipos, particularmente IgG1 e IgG4.

El SC104 se ha demostrado que provoca la muerte de líneas celulares tumorales en suspensión y provocar la aparición específica de apoptosis o muerte celular programada en tumores colorrectales y células derivadas de tejido tumoral desagregado. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden ser usados como agentes terapéuticos para inhibir el crecimiento o inducir la apoptosis en tumores. La apoptosis es el procedimiento mediante el cual una célula activamente comete suicidio. Es actualmente reconocido que la apoptosis es esencial en muchos aspectos del desarrollo normal y es necesaria para mantener la homeostasis de tejidos. Sin embargo, la muerte celular por suicidio, a veces denominada muerte celular programada, es necesaria para destruir células que representan una amenaza para la integridad del organismo. Hay dos mecanismos diferentes mediante los cuales una célula comete suicidio mediante apoptosis. Uno es activado por señales que surgen desde dentro de

la célula y el otro mediante señales externas (por ejemplo, moléculas) que se unen a receptores en la superficie de la célula.

5 Los anticuerpos de la presente invención pueden ser usados en métodos de diagnóstico y tratamiento de tumores en sujetos humanos o animales.

10 Cuando se usan en diagnóstico, los miembros de unión específica de la invención pueden ser etiquetados con un marcador detectable, por ejemplo, un radiomarcador como  $^{131}\text{I}$  o  $^{99}\text{Tc}$ , que pueden ser unidos a anticuerpos de la invención usando una química convencional conocida en la técnica de la formación de imágenes de anticuerpos. Los marcadores incluyen también marcadores de enzimas como peroxidasa de rabanillo. Los marcadores incluyen adicionalmente restos químicos como biotina, que pueden ser detectados a través de la unión a un resto detectable afín, por ejemplo, avidina marcada.

15 Aunque los anticuerpos de la invención se ha mostrado por sí mismos que son eficaces para destruir células cancerosas, adicionalmente pueden ser marcados con un marcador funcional. Los marcadores funcionales incluyen sustancias que están diseñadas para ser dirigidas a diana al sitio del cáncer para provocar su destrucción. Estos marcadores funcionales incluyen toxinas como ricina y enzimas como carboxipeptidasa bacteriana o nitrorreductasa, que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos. Además, los miembros de unión específica pueden estar unidos o asociados de algún otro modo a agentes quimioterapéuticos o citotóxicos, como caliqueamicina, o radiomarcadores como  $^{90}\text{Y}$  o  $^{131}\text{I}$ .

20 Además, los anticuerpos de la presente invención pueden ser administrados solos o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o secuencial, dependiendo del estado que va a ser tratado. Por tanto, la presente invención proporciona adicionalmente productos que contienen un anticuerpo de la presente invención y un agente activo en forma de una preparación combinada para un uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un tumor. Los agentes activos pueden incluir agentes quimioterapéuticos o citotóxicos que incluyen 5-fluorouracilo, cisplatino, mitomicina C, oxaliplatino y tamoxifeno, que funcionan de forma sinérgica con los miembros de unión de la presente invención. Otros agentes activos pueden incluir dosis adecuadas de fármacos para aliviar el dolor como fármacos antiinflamatorios no esteroidales (por ejemplo, aspirina, paracetamol, ibuprofeno o cetoprofeno) u opiáceos como morfina o anti-eméticos.

25 Aunque no se desean vinculaciones teóricas, la capacidad de los miembros de unión de la presente invención para realizar una acción sinérgica sobre un agente activo, para mejorar la destrucción tumoral, puede no ser debida a mecanismos efectores inmunes, sino que puede ser una consecuencia directa de la unión del anticuerpo al hidrato de carbono de sialiltetraosilo unido a la superficie celular.

30 Los anticuerpos de la presente invención serán administrados habitualmente en la forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del anticuerpo. La composición farmacéutica puede comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, diluyente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral o mediante inyección, por ejemplo, intravenosa.

35 Está previsto que las inyecciones sean la vía principal para la administración terapéutica de las composiciones, aunque puede ser usado también un suministro a través de un catéter u otros tubos quirúrgicos. Algunas vías adecuadas de administración incluyen la administración intravenosa, subcutánea e intramuscular. Pueden ser utilizadas formulaciones líquidas después de la reconstitución en formulaciones de polvos.

40 Para una inyección intravenosa, o inyección en el sitio afectado, el ingrediente activo estará en la forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que esté exenta de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer lactada. Pueden ser incluidos conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos, en la medida necesaria.

45 Las composiciones farmacéuticas para una administración oral pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos o líquidos. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un vehículo líquido como gual, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden ser incluidos solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando la formulación es un líquido puede ser, por ejemplo, una solución salina fisiológica que contenga un tampón que no es de fosfatos a pH 6,8-7,6, o un polvo liofilizado.

50 La composición puede ser administrada también a través de microesferas, liposomas, otros sistemas de suministro de micropartículas o formulaciones de liberación sostenida colocadas en ciertos tejidos, incluida la sangre. Ejemplos adecuados de vehículos de liberación sostenida incluyen matrices polímeras semipermeables en la forma de

artículos compartidos, por ejemplo, supositorios o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida implantables o microcapsulares incluyen poliláctidos (patente de EE.UU. nº 3.773.919; documento EP-A-0058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al, *Biopolymers* 22(1): 547-556, 1985), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o etileno-acetato de vinilo (Langer et al, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277, 1981, y Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105, 1982). Los liposomas que contienen los polipéptidos se preparan mediante métodos bien conocidos: documento DE 3.218.121A; Epstein et al, *PNAS USA*, 82: 3688-3692, 1985; Hwang et al, *PNAS USA*, 77: 4030-4034, 1980; documentos EP-A-0052522; E-A-0036676; EP-A-0088046; EP-A-0143949; EP-A-0142541; JP-A-83-11808; patentes de EE.UU. nº 4.485.045 y 4.544.545. Ordinariamente, los liposomas son del tipo unilaminar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en los que el contenido de lípidos es mayor que aproximadamente 30% en moles de colesterol, siendo ajustada la proporción seleccionada hasta la velocidad óptima de las pérdidas de polipéptidos.

La composición puede ser administrada de una manera local a un sitio de tumor u otro sitio deseado o puede ser suministrada de una manera que sea dirigida a diana a células tumorales u otras.

Las composiciones son administradas preferentemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar el beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y duración de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que esté siendo tratado. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre dosificación etc., está dentro de la responsabilidad de los facultativos generales y otros doctores médicos, y normalmente tiene en cuenta el trastorno que va a ser tratado, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Las composiciones de la invención son particularmente relevantes para el tratamiento de tumores existentes, especialmente cáncer, y la prevención de la recurrencia de estos estados después de un tratamiento inicial o cirugía. Ejemplos de las técnicas y protocolos anteriormente mencionados se pueden encontrar en la publicación Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A. (ed), 1980.

La dosis óptima puede ser determinada por facultativos basándose en un cierto número de parámetros que incluyen, por ejemplo, edad, sexo, peso, gravedad del estado que esté siendo tratado, el ingrediente activo que esté siendo administrado y la vía de administración. En general, es deseable una concentración en suero de los polipéptidos y anticuerpos que permita una saturación de receptores. Normalmente es suficiente una concentración en exceso de aproximadamente 0,1 nM. Por ejemplo, una dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> de anticuerpo proporciona una concentración en suero de aproximadamente 20 nM durante aproximadamente ocho días.

Como norma general, las dosis de anticuerpos pueden ser proporcionadas semanalmente en cantidades de 10-300 mg/m<sup>2</sup>. Se deben usar dosis equivalentes de fragmentos de anticuerpos a intervalos más frecuentes con el fin de mantener un nivel en suero en exceso de la concentración que permite la saturación de hidrato de carbono de sialiltetraosilo.

La dosis de la composición dependerá de las propiedades del miembro de unión, por ejemplo, su actividad de unión y la semi-vida en plasma *in vivo*, la concentración de polipéptido en la formulación, la vía de administración, el sitio y velocidad de dosificación, la tolerancia clínica del paciente involucrado, el estado patológico que afecta al paciente y similares, así como los que entren en los conocimientos del facultativo. Por ejemplo, se prefieren dosis de 300 µg de anticuerpo por paciente por administración, aunque las dosis pueden variar en el intervalo de aproximadamente 10 µg a 6 mg por dosis. Se utilizan diferentes dosis durante una serie de inoculaciones secuenciales; el facultativo puede administrar una inoculación inicial y seguidamente activarla con dosis relativamente más pequeñas de anticuerpo.

Esta invención se dirige también a optimizar esquemas de inmunización para mejorar la respuesta inmune protectora contra el cáncer.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser generados completa o parcialmente mediante síntesis química. Los miembros de unión pueden ser fácilmente preparados según métodos de síntesis de péptidos en fase líquida o, preferentemente, sólida, estándar y bien establecidos, de los cuales están ampliamente disponibles descripciones generales (véase, por ejemplo, en J.M. Stewart and J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984), en M. Bodanzsky and A. Bodanzsky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, New York (1984); y *Applied Biosystems 430A Users Manual*, ABI Inc., Foster City, California), o pueden ser preparados en solución, mediante el método en fase líquida o mediante cualquier combinación de fase sólida, fase líquida y química en solución, por ejemplo, completando primero el respectivo residuo X péptido mediante reacción del respectivo ácido carbónico o sulfónico o un reactivo derivado de los mismos.

Otra forma conveniente de producir un anticuerpo según la presente invención es expresar el ácido nucleico que lo codifica, mediante el uso de ácido nucleico en un sistema de expresión.

También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquier anticuerpo de la invención. El ácido nucleico incluye DNA y RNA. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención como se definió anteriormente. Ejemplos de este ácido nucleico se muestran



en las figuras 1a, 1b y 1c. El experto en la técnica será capaz de determinar las sustituciones, supresiones y/o adiciones a estos ácidos nucleicos que proporcionarán un miembro de unión específica de la presente invención.

También se proporcionan constructos en la forma de plásmidos, vectores, cassettes de transcripción o expresión que comprenden al menos un ácido nucleico como se describió anteriormente. La presente invención proporciona también una célula hospedante recombinante que comprende uno o más constructos como anteriormente. Como se mencionó, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención forma un aspecto de la presente invención, como también un método de producción del anticuerpo, método que comprende la expresión a partir de la codificación de un ácido nucleico para el mismo. La expresión se puede conseguir convenientemente cultivando bajo condiciones apropiadas células hospedantes que contienen el ácido nucleico. A continuación de la producción mediante expresión, puede ser aislado y/o purificado un anticuerpo usando cualquier técnica adecuada y seguidamente se usa en la forma apropiada.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de células hospedantes diferentes son bien conocidos. Las células hospedantes adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, levadura y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovarios de hamster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hamster, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un hospedante bacteriano preferido y común es *E. coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procarióticas como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Para una recopilación, véase por ejemplo la publicación Plückthun, *Bio/Technology* 9:545-551 (1991). La expresión de células eucarióticas en cultivo está disponible también para los expertos en la técnica como una opción para la producción de un miembro de unión específica, véase para una recopilación reciente, por ejemplo, Reff, *Curr. Opinion Biotech.* 4:573-576 (1993); Trill et al., *Curr. Opinion Biotech.* 6:553-560 (1995).

Pueden ser escogidos o construidos vectores adecuados, que contengan secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias mejoradoras, genes marcadores y otras secuencias que sean apropiadas. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, por ejemplo, fagos, o fagémidos, como sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 2nd Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de de constructos de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciado, introducción de DNA en células y expresión génica, y análisis de proteínas, están descritas en detalle por Ausubel et al. eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd Edition, John Wiley & Sons (1992).

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula hospedante que contiene ácido nucleico, como se describe en la presente memoria descriptiva. Todavía, un aspecto adicional proporciona un método que comprende introducir este ácido nucleico en una célula hospedante. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucarióticas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo, vacunas o, para células de insectos, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos. La introducción se puede realizar provocando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células hospedantes bajo condiciones para la expresión del gen.

En una realización, el ácido nucleico de la invención está integrado en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedante. La integración puede ser favorecida mediante la inclusión de secuencias que favorezcan la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

También se proporciona un método que comprende usar un constructo, como se estableció anteriormente, en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión específica o polipéptido como anteriormente.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos *mutatis mutandis*. Los documentos de la técnica anterior mencionados en la presente memoria descriptiva se incorporan hasta el alcance más completo legalmente permitido.

## Ejemplos

La invención se describirá seguidamente de forma adicional en los siguientes ejemplos no limitativos. Se hace referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

La figura 1a muestra las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo SC104 y una parte de la región constante, la figura 1b muestra la secuencia igual a la indicada en la figura 1a pero en la que ha sido empleado el sistema de numeración de Kabat, y la figura 1c muestra las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo SC10r y una parte de la región constante. La figura 1d demuestra que la versión química del anticuerpo SC104, producida mediante una línea celular transfectada, se une a la línea de células dianas.

- La figura 2a es un gráfico que demuestra la unión de SC104 a un panel de líneas celulares (Colo205, C170, MCF-7, MDA-231, MDA-435, T47D, ZR75, MKN45, RID9, T24, A431, PA1 y OAW28 (obtenida de la entidad ECACC)). Las células fueron teñidas mediante el ensayo ELISA y los resultados se expresan en forma de absorbancia (405 nm) para cada línea celular. La figura 2b es un gráfico que demuestra la unión de SC104 a las siguientes líneas celulares: C170, HT-29, LoVo, Colo205, MKN45, RID9 y A431. Las células fueron teñidas mediante inmunofluorescencia indirecta y analizadas mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como X media para cada línea celular. El SC101/29 es suministrado por la entidad Scancell como un testigo positivo y reconoce Lewis<sup>y/b</sup>. Se usa un anticuerpo de isotipo coincidente como un testigo negativo.
- La figura 3 es un gráfico que demuestra la unión de anticuerpos monoclonales a células tumorales colorrectales, según se ensaya mediante inmunofluorescencia indirecta y se analiza mediante citometría de flujo. Cada punto se refiere a la fluorescencia media para un tumor individual.
- La figura 4 es un gráfico que demuestra la unión de SC104 mab a CEA purificado, antígeno C14 y extracto de glicolípido tumoral. El antígeno C14 (glicoproteína de 90 KDa purificada a partir de saliva mediante cromatografía de afinidad en C14 monoclonal), CEA (glicoproteína de 180 KDa purificada a partir de metástasis vivas de tumor colorrectal mediante cromatografía de afinidad con 365 mab) y extracto de glicolípido (glicolípido extraído en 3:1 de metano cloroformo p/v de tumores colorrectales) se secaron en placas de microtitulación mediante incubación durante una noche a 37°C. Las uniones de SC104 mab fue ensayada mediante ensayo ELISA y los resultados se expresaron como 405 nm de absorbancia. Se incluyeron SC101 y anticuerpos anti-CEA como testigos positivos.
- La figura 5 muestra placas de HPTLC que muestran A. Inmunotinción de SC104 de fracciones recogidas de una columna de volumen de lecho de 36 ml. La columna W es el extracto de C170 completo antes del fraccionamiento. Las primeras fracciones de 6 x 10 ml recogidas se recogen con puntos en las columnas 1 a 6 mientras que las 14 últimas columnas representan las siguientes fracciones de 14 x 3 ml recogidas. El antígeno SC104 puede estar ubicado en la fracción 6, con un R<sub>F</sub> de 0,53. B. En anticuerpo secundario solo muestra ausencia de banda, indicando que la unión es específica a SC104.
- La figura 6 es una placa de HPTLC que muestra (A) Tinción con orcinol de fracción 6 que pone de manifiesto tres bandas con valores de R<sub>F</sub> entre R<sub>F</sub> 0,50 y 0,61. (B) Inmunotinción con SC104 de la misma fracción proporcionó tres bandas apretadas entre R<sub>F</sub> 0,36 y 0,39.
- La figura 7 es una placa de HPTLC que muestra inmunotinción con SC104 de extracto de C170 completo (columna W), fracción 6 (columna 6) y lípido des-glicosilado (columna L). Se observó antígeno en el extracto completo y fracción 6 (R<sub>F</sub> 0,38 a 0,46), pero ya no se detectó en la fracción lípida a continuación de una desglicosilación mediante ceramida glicanasa.
- La figura 8 es una placa de HPTLC que muestra inmunotinción con SC104 de antígeno parcialmente purificado. Las marcas a lápiz indican la ubicación de lípido detectado mediante tinción con vapor de yodo. Las columnas 1 y 2 contienen el antígeno tratado con ceramida glicanasa a continuación de una separación en las fases acuosa y orgánica, respectivamente. Los oligosacáridos liberados se someterán a partición en la fase acuosa y los lípidos libres en la fase orgánica. Cualesquiera glicolípidos sin digerir se someterán a partición en cualquiera fase dependiendo de la polaridad global. Las columnas 3 y 4 son las mismas fracciones sometidas a partición acuosa y orgánica en ausencia de ceramida glicanasa. El antígeno es detectado (R<sub>F</sub> 0,48 y 0,40) antes de la desglicosilación pero no a continuación de la separación de oligosacáridos.
- La figura 9 es una placa de HPTLC que muestra inmunotinción con SC104 (A) y tinción con orcinol (B) de fracciones simple (columna S), glicolípidos (columna G) y fosfolípidos (columna P) a partir de células C170. El antígeno es detectado en las fracciones simple y de fosfolípidos (R<sub>F</sub> 0,54, 0,51 y 0,41) pero no la parte de glicolípidos neutra. La tinción con orcinol pone de manifiesto dos bandas distintas en la fracción de fosfolípidos (R<sub>F</sub> 0,54 y 0,51) que se desplaza conjuntamente con el antígeno.
- La figura 10 muestra placas de HPTLC de 2 dimensiones de extracto lípido completo de C170 seguido de inmunotinción con orcinol (A) o SC104 (B). La primera dimensión fue revelada en 50:40:10 de cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> (0,5% p/v) y la segunda dimensión en 10:4:2:2:1 de cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua. El antígeno se desplaza con R<sub>F</sub> 0,48 y la 1ª dimensión y no se desplaza en la 2ª. Se observa nuevamente que una banda teñida con orcinol se desplaza conjuntamente con el antígeno.
- La figura 11 es una placa de HPTLC que muestra la inmunotinción con SC104 de antígeno con (columnas 1 y 2) y sin (columna 3) de-sialilación mediante digestión con neuroaminidasa. La de-sialilación dio lugar a una tinción más intensa de menor agrupación polar (R<sub>F</sub> 0,46 y una disminución de tinción de la agrupación más polar (R<sub>F</sub> 0,62).
- La figura 12 muestra una placa de HPTLC de fracciones lípicas de C170 a partir de una columna de sílice. Las placas fueron sondadas con SC104 (A), anticuerpos secundarios solamente (B) o teñidas con orcinol (C) o ninhidrina (D). El antígeno fue detectado en el extracto completo (columna W) y las fracciones de glicolípidos sialilados

(comunas N<sup>1</sup>, N<sup>2</sup> y N<sup>3</sup>). No se observó ningún antígeno en la fracción de glicolípidos simple (columna S) o fosfolípida/neutra (columna P).

5 La figura 13 es un gráfico que demuestra que aunque el antígeno SC104 se observó que tenía reacción cruzada con SC104, no tuvo reacción cruzada con un anti-sialil Lewis<sup>a</sup> (una biomolécula previamente evaluada para el potencial clínico) o anticuerpo 19/9.

10 La figura 14 demuestra, usando una columna sefarosa de SC104-Proteína A, una banda para el antígeno inmunopurificado con SC104 entre 50-75 KDa, como se identificó en un gel teñido con plata.

15 La figura 15 muestra la fracción de SC104 purificada a partir de esputo que compete con SC104 biotina para unirse a células de C170.

La figura 16 es un histograma que demuestra el efecto de SC104, o anticuerpos 791T/36 testigo, sobre células tumorales C170. Las células fueron teñidas con Anexina marcado con FITC y yoduro de propidio y seguidamente fueron analizadas mediante citometría de flujo de color dual. Los resultados se expresan con el T de tinción de células con Anexina, yoduro de propidio o ambos. el SC101/29 es incluido como un testigo positivo.

20 La figura 17 es un gráfico para mostrar la activación de FITCz-FMK-vad de pan caspasa después de 6 h de exposición a células C170 adherentes. Los resultados se expresan como X media.

La figura 18 demuestra la activación de caspasa 6 sobre células adherentes tratadas con el anticuerpo SC104. Las células tratadas con anticuerpos SC101 son incluidas como un testigo negativo.

25 La figura 19 demuestra que si las células tratadas con SC104 (A) son expuestas también a inhibidor z-FMK-vad 3 μM (B), la muerte celular puede ser significativamente reducida según se ensaya usando Anexina V FITC y yoduro de propidio.

30 La figura 20 muestra gráficos que muestran el % de viabilidad (número células expuestas al fármaco/número de células expuestas a testigo) de una gama de líneas celulares tumorales (Colo205, C170, HT29 y LoVo). El número de células viables se determinó mediante MTS y la lectura de la densidad óptica a 490 nm.

35 La figura 21 demuestra que los ajustes de IC<sub>50</sub> para las líneas celulares tumorales, C170, Colo205, HT-29 y LoVo se extrapolaban a partir de resultados típicos de la viabilidad celular (% viabilidad = número de células expuestas al fármaco/número de células expuestas al testigo), según se determinó mediante MTS y lectura de la densidad óptica a 490 nm.

40 La figura 22 es un gráfico para mostrar que la fijación de células tumorales, mediante Cillfix o glutaraldehído, no altera significativamente la unión del anticuerpo a la línea celular tumoral C170 en comparación con las no tratadas en medios solos. Las células fueron teñidas mediante inmunofluorescencia indirecta, analizadas mediante citometría de flujo y los resultados se expresaron como valores fluorescentes lineales medios.

45 La figura 23a muestra que el SC104 no se une a una naturaleza homofílica en ausencia de antígeno. Se revistieron placas de microtitulación con anticuerpos específico IgG Fc anti-ratón de cabra antes de añadir concentraciones crecientes de anticuerpo SC104. El anticuerpo SC104 unido se detectó mediante ensayo ELISA con peroxidasa de rabanillo anti-ratón de cabra y TMB. Para determinar si el SC104 se podría unir por sí mismo se añadió SC104 biotina y se detectó su unión con SA-HRP/TMB. Se incluyeron testigos, SC104 que no pueden ser detectados con SA-HRP/TMB pero tanto SC104 como SC104 biotina pudieron ser detectados con HRP anti-ratón de cabra. Los resultados se expresan como absorbancia a 570 nm. La figura 23b muestra seguidamente que el SC104 se une de una forma homofílica en presencia de antígeno C14. Las placas fueron revestidas con antígeno C14 y se añadió SC104 a cada pocillo al antígeno. Esto se confirmó con HRP/TMB anti-ratón de cabra. El SC104 biotina fue seguidamente añadido a concentraciones crecientes y se unió se detectó con SA-HRP/TMB. Los resultados se expresan como absorbancia a 650 nm.

55 La figura 24 es un gráfico que demuestra el efecto de 5-fluorouracilo y anticuerpo SC104 sobre células. Las células fueron expuestas a SC104 o anticuerpo 791T/36 testigo (no mostrado) y 5-FU. El número de células se determinó mediante MTS y la lectura de la densidad óptica a 490 nm.

60 La figura 25 es un gráfico que demuestra los efectos de 5-FU, cisplatino, mitomicina C, oxaliplatino y Tamoxifeno sobre células C170 solas o en combinación con anticuerpo SC104, o con anticuerpo SC104 solo.

65 La figura 26 muestra gráficos que demuestran el efecto de SC104, 5-FU/leucovorina y una combinación de SC104 y 5FU/leucovorina sobre el crecimiento de xenoinjertos de C170 en crecimiento en ratones desprovistos de sistema inmune. a) El crecimiento de xenoinjertos de C170 se midió en los días 7, 9, 12, 14 y 16 mediante la medición del área transversal-seccional (mm<sup>2</sup>) cuando los animales fueron tratados con SC104 ip (0,2 mg), anticuerpo testigo ip (0,2 mg) y 5-FU/leucovorina (12,5 mg/kgiv) o SC104 ip (0,2 mg) y 5-FU/leucovorina (125 mg/kg iv) en los días 1, 3, 5, 7, 21 y 22.

b) Un gráfico de supervivencia que demuestra el efecto de SC104, 5-FU/leucovorina o la combinación de SC104 y 5-FU sobre la supervivencia de ratones desprovistos de sistema inmune que expresan xenoinjertos de C170. Los animales fueron tratados con SC104 ip (0,2 mg), anticuerpo testigo ip (0,2 mg) y 5-FU/leucovorina (12,5 mg/kg iv) o SC104 ip (0,2 mg) y 5FU/leucovorina (12,5 mg/kg iv) en los días 1, 3, 5, 7, 21 y 22. c) Los animales fueron pesados los días 7, 14, 21, 28 y 36 a continuación de un tratamiento con SC104 ip (0,2 mg), anticuerpo testigo ip (0, mg) y 5-FU/leucovorina (12,5 mg/kg iv) o SC104 ip (0,2 mg) y 5-FU/leucovorina (12,5 mg/kg iv) en los días 1, 3, 5, 7, 21 y 22.

La figura 27 es un gráfico que demuestra el efecto de SC104, 5 FU/leucovorina y una combinación de SC104 y 5FU/leucovorina sobre el crecimiento de xenoinjertos C170 en crecimiento en ratones desprovistos de sistema inmune. Los ratones fueron tratados con FU/leucovorina 25 mg/kg iv en los días 1, 3, 5, 7, 21, 22 y con anticuerpo SC104 (0,2 mg) tres veces por semana partiendo el día 5. El crecimiento de xenoinjertos C170 se midió los días 7, 9, 12, 14 y 16 midiendo el área de sección transversal ( $\text{mm}^2$ ) cuando los animales fueron tratados con SC104 ip (0,2 mg), anticuerpo testigo ip (0,2 mg) y 5FU/leucovorina o SC104 ip (0,2 mg) y 5FU/leucovorina. Un gráfico que demuestra el efecto de SC101, 5FU/leucovorina o la combinación de SC101 y 5FU sobre la supervivencia de ratones desprovistos de sistema inmune que expresan xenoinjertos C170.

#### Ejemplo 1 - Producción de anticuerpo monoclonal SC104

#### MÉTODOS

*Inmunización:* Se usó una gama de líneas celulares tumorales aisladas en el protocolo de inmunización para la producción de SC104 siguiendo el régimen indicado en la Tabla 1. Ratones hembras BALB/c (6-12 semanas de edad, Bantin and Kingman, Hull) fueron inmunizados con 100  $\mu\text{l}$  de suspensión de células C146, C168, C170 y JW a ratones BALB/c de 0, 4, 13 y 14 meses, respectivamente. Se usó una densidad celular de  $5 \times 10^6$  células/ml para las dos primeras inmunizaciones, mientras que la densidad se redujo hasta  $5 \times 10^5$  células/ml para las dos segundas inmunizaciones. Las células se pusieron en suspensión en adyuvante completo de Freund en el primer caso con la segunda y posteriores inmunizaciones usando adyuvante incompleto de Freund. Después de 5 días de la inmunización final, se recogieron células de bazo y se fusionaron con células PSNS1.

Tabla 1 - Protocolo de inmunización

Día	Tipo de célula	Número de células	Vía de administración
0	C170	$5 \times 10^6$	Ip
42	C146	$5 \times 10^6$	Ip
56	Colo205	$5 \times 10^5$	Ip
96	JW	$5 \times 10^5$	Ip

#### Producción de hibridomas

El ratón fue sacrificado mediante dislocación cervical y el bazo fue extirpado asépticamente. El bazo fue transferido a un plato de petri que contenía RPMI exento de suero (20 ml, 37°C) y las células fueron suavemente liberadas en el medio. El debris de tejidos se dejó sedimentar a partir de la suspensión celular bajo gravedad durante dos minutos. Las células de esplenocitos individuales que permanecían en suspensión fueron seguidamente recuperadas mediante centrifugación, se volvieron a poner en suspensión en RPMI exento de suero y se contaron. Las células P3NS 1 recogidas fueron contadas y se volvieron a poner en suspensión. Los dos tipos de células se mezclaron en una relación de 1:10 células, P3NS:esplenocitos. La mezcla celular se recuperó en forma de un sedimento y se esponjó mediante golpeteo suave. Se añadió polietilenglicol 1500 caliente (solución al 50% disponible en el comercio en la empresa Sigma Chemicals) durante 1 minutos, seguido de incubación a temperatura ambiente (1 minutos). Seguidamente se añadieron medios exentos de suero calientes durante un minuto adicional seguido de la adición lenta de 20 ml adicionales de medio exento de suero. Las células nuevamente puestas en suspensión se recuperaron en forma de un sedimento y se dispersaron suavemente en RPMI1640 caliente que contenía 15% de suero bovino fetal y agentes de selección HAT. La suspensión celular se dividió en partes alícuotas sobre placas de 96 pocillos previamente revestidas con células de exudados peritoneales de rata (PECS). Las placas fueron seguidamente incubadas a 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ , 95% de aire hasta que pudieran ser observadas colonias de células de hibridomas supervivientes. La producción de anticuerpo específico de tumor de colon fue seleccionada para usar células C170 como la capa primaria en un ensayo ELISA en emparedado no competitivo. Las células de un cierto número de pocillos positivos se agruparon y se dispusieron en placas en placas de 96 pocillos a densidades celulares de 5, 2,5, 1 y 0,5 células/pocillo (100  $\mu\text{l}$ /pocillo). Las placas fueron incubadas a 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ , 95% de aire hasta que los medios en los pocillos con colonias se volvieron color naranja.

#### Procedimientos de selección

*ELISA.* Las respuestas de anticuerpos en el suero de ratones inmunizados fueron analizadas mediante titulación usando un procedimiento ELISA no competitivo estándar. Se revistieron placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos

con células C170 a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/ml (100  $\mu$ l/pocillo) en suero bovino fetal al 10% en RPMI 1640. Las placas fueron incubadas durante una noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire. Las células fueron seguidamente lavadas dos veces en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,5, PBS) antes de ser fijadas con glutaraldehído al 5% en PBS (10 minutos, 25°C, 100  $\mu$ l/pocillo). Los sitios de unión no específica restantes fueron bloqueados mediante incubación durante 1 h con albúmina de suero bovino al 1% (fracción V de la empresa Sigma Chemicals Ltd.) en PBS. Las células fueron lavadas tres veces con una solución de lavado que consistía en 0,05% de Tween 20 en solución salina tamponada con fosfato antes de ensayar el suero post-reforzado en cuanto a la unión a células C170 usando un ensayo ELISA en emparedado no competitivo. Se usó el suero de pre-inmunización como un testigo negativo.

**Imunohistoquímica.** La unión de materias sobrenadantes de hibridomas a tejidos tumorales se determinó mediante tinción indirecta con inmunoperoxidasa de secciones tumorales colorrectales congeladas. Secciones de tejidos (5  $\mu$ m) de tumor crioconservado fueron tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en 0,1% de NaN<sub>3</sub> durante 15 minutos para inhibir peroxidasa endógena. Esto estuvo seguido de incubación a temperatura ambiente con suero humano al 10% y BSA al 1% preparado en PBS, durante 30 minutos, y seguidamente las se añadieron materias sobrenadantes de hibridoma a niveles de saturación que proporcionaron una tinción de fondo no específica mínima durante 30 minutos adicionales. El anticuerpo unido fue detectado con Ig anti-ratón de conejo conjugado a peroxidasa (Dako Lt.d, Bucks, Reino Unido) y a continuación de un lavado intensivo la láminas fueron teñidas con diaminobencidina al 0,05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01% en Tri-HCl 0,05 M, pH 7,6 y contra-teñidas con hematoxilina.

## RESULTADOS

El SC104 es un anticuerpo monoclonal (mab) que se hizo surgir mediante inmunización de ratones con 4 líneas celulares de colon colorrectal. Fue seleccionado mediante inmunohistoquímica frente a secciones tumorales colorrectales y mediante ensayo ELISA frente a una de las líneas celulares de inmunización. Fue clonado tres veces y se mostró que era un IgG1 mab de ratón. La Tabla 2 muestra que se une a células C170 con una intensidad mayor que un anticuerpo testigo positivo que reconoce hapteno de Lewis<sup>y/b</sup>. Mostró también una tinción intensa de tumores colorrectales en comparación con anticuerpos de Lewis<sup>y/b</sup> o anticuerpo anti-CEA. Mostró una tinción débil similar de tejidos de colon normales respecto a anticuerpo anti-CEA.

Tabla 2 - Selección de SC104 mab

Anticuerpo	C170 ELISA (OD 405 nm)	Inmunohistoquímica <sup>a</sup>	
		Tumor colorrectal	Colon normal
SC104	0,301	3+	+
Anti-Lewis <sup>y/b</sup>	0,161	2+	Tinción con mucina solo
Anti-CEA	0,001	2+	+
Sin anticuerpo	0,001	-	-

a- - negativa, + mínima, 2+ fuerte, 3+ muy fuerte

### Ejemplo 2 - Secuencia del anticuerpo SC104

#### MÉTODOS

**Amplificación y secuenciado de las regiones variables de cadenas pesada y kappa ligera de la inmunoglobulina de ratón SC104.** Se aisló RNA total a partir del hibridoma SC104/1E9 después de comprobar previamente la producción de anticuerpos mediante ensayo ELISA. Se usó cDNA sintetizado a partir de 5  $\mu$ g de RNA total como una plantilla para la amplificación de los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de SC104. Los siguientes oligonucleótidos directos que se asocian a la secuencia líder y los oligonucleótidos inversos al dominio CH1 de la región constante de cada cadena fueron utilizados, respectivamente, en las reacciones PCR con la enzima de fidelidad elevada *pfu turbo* (Stratgene).

#### *Cebadores directos*

5'-ATG AGA GTG CTG ATT CTT TTG TG-3' Cadena pesada

5'-ATG GAT TT(A/T) CA(A/G) GTG CAG ATT (A/T)TC AGC TTC-3' Cadena kappa

#### *Cebadores inversos*

5'-CCC AAG CTT CCA GGG (A/G)CC A(A/G)(G/T) GGA TA(A/G) ACG G(A/G)T GG-3' Cadena pesada

5'-CCC AAG CTT ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA-3' Cadena kappa

Los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector de TA pCR2.1 (Invitrogen). Los clones que contenían inserto fueron identificados mediante análisis de restricción y confirmados mediante secuenciado de DNA con los cebadores T7 y M13 inverso (Lark Technologies). Las secuencias fueron analizadas y las siguientes regiones determinantes complementarias (CDR's) fueron identificadas en cuanto a la cadena pesada y ligera del anticuerpo SC104 (figura 1a, b y c).

Para verificar que el análisis del secuenciado y traducción fue correcto para las dos cadenas, se desnaturalizaron 10 µg de anticuerpo SC104 purificado y concentrado, separado en un gel de SDS-PAGE al 8% de 0,75 mm de grosor mediante electroforesis y se transfirió a PVDF mediante electrotransferencia semi-seca. Después de teñir con blanco de Amido, las cadenas kappa (25 KDa) y pesada (50 KDa) fueron aisladas y secuenciadas de forma N-terminal mediante degradación de Edman (Alta Biosciences). El secuenciado de proteínas confirmó el DNA analizado y las secuencias tradicidas para las dos cadenas

*Cadena pesada*

Región variable (55 bp-414 bp)

**CDR1** (130bp-162bp)

G Y S I T S G Y S W H  
GGCTACTCCATCACGAGTGGTTATAGTTGGCAC

Según la numeración de Kabat (145 bp-162 bp)

S G Y S W H  
AGTGGTTATAGTTGGCAC

**CDR2** (205bp-252bp)

H I H F S G R P T Y N P S L S S  
CACATTCACTTCAGTGGTAGACCTACTTACAATCCATCTCTCAGCAGT

**CDR3** (349bp-381bp)

K G K G S D D G L N Y  
AAGGGAAAAGGTTCCGACGATGGTTTGAACCTAC

Secuencia líder señalizadora

FR1 (55 bp-129 bp)

FR2 (163 bp-204 bp)

FR3 (253 bp-348 bp)

FR4 (382 bp-414 bp)

CH1 (415bp en adelante)

*Cadena ligera kappa*

Región variable (67 bp-384 bp)

**CDR1** (136bp-165bp)

S A S S S L S Y I H  
AGTGCCAGCTCAAGTTTAAGTTACATACAC

**CDR2** (211bp-231bp)

D T S N L A S  
GACACATCCAACCTGGCTTCT

**CDR3** (328bp-354bp)

F Q G S E Y P L T  
TTTCAGGGGAGTGAGTATCCACTCAGC

Secuencia líder señalizadora (1 bp-66 bp)

FR1 (67 bp-135 bp)

5 FR2 (166 bp-210 bp)

FR3 (232 bp-327 bp)

10 FR4 (355 bp-384 bp)

CH1 (385 bp en adelante)

Ejemplo 3 - Expresión de anticuerpo monoclonal SC104 quimérico

15 Para verificar la expresión de anticuerpo monoclonal a partir de las secuencias de DNA, se incorporaron los sitios de restricción Afe1 y BsiW1 en las regiones variables de cadena pesada y ligera en el extremo del marco 4 en pCR2.1 mediante mutagénesis dirigida al sitio usando los oligonucleótidos complementarios diseñados.

*Afe1 variable de cadena pesada*

20

Cebador directo

5'-C TCA GTC ACC GTC TCT AGC GCT AAA ACG ACA CCC CCA CC-3'

25 Cebador inverso

5'-GG TGG GGG TGT CGT TTT AGC GCT AGA GAC GGT GAC TGA G-3'

*BsiW1 variable de cadena ligera*

30

Cebador directo

5'-CC AAG CTG GAA ATG ACA CGT ACG GAT GCT GCA CCA ACT G-3'

35 Cebador inverso

5'-C AGT TGG TGC AGC ATC CGT ACG TGT CAT TTC CAG CTT GG-3'

40 Las regiones variables de cadena pesada y ligera de muridos de SC104 fueron extraídas a partir de pCR2.1 y clonadas en los sitios HindIII/Afe1 y BamHI/BsiW1 del vector de expresión de mamífero pDCORIG IB fusionado en marco con la región constante Fc humana de cada cadena, respectivamente. Este plásmido fue identificado mediante análisis de restricción y confirmado mediante secuenciado de DNA.

45 Se transfectó establemente CHO-S con 15 µg del plásmido anterior y genejuice (Novagen) según las recomendaciones del fabricante. Los transfectantes fueron seleccionados en medio que contenía Zeocin (300 µg/ml) durante 14 días. La expresión de anticuerpo SC104 quimérico funcional secretado a partir de los transfectantes fue confirmada mediante unión a la superficie celular de la línea celular C170 y citometría de flujo (figura 1d).

50 De forma breve, después de lavar en RPMI/10% FCS, las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con medio agotado que contenía el anticuerpo quimérico o bien con medio solo. Las células se lavaron y se incubaron durante 30 minutos adicionales a 4°C con un anticuerpo IgG anti-humano de conejo conjugado con FITC específico para el dominio CH2 (DAKO, F0123). Las células se lavaron nuevamente, se volvieron a poner en suspensión y se analizaron mediante citometría de flujo.

55 Ejemplo 4 - Estudios de unión usando anticuerpo monoclonal SC104

EXPERIMENTO 1

*Métodos*

60

*Tinción de inmunohistoquímica de tejidos normales y tumorales.* Se obtuvieron tejidos a partir de un proveedor aprobado por Inveresk. Cada tejido usado fue congelado instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenado a aproximadamente -70°C (± 10°C). Las secciones criostáticas fueron cortadas y colocadas en láminas supercongeladas plus. Todas las muestras de tejidos fueron tratadas con marcador de antígeno apropiado para cada tejido, con el fin de confirmar la conservación de antígenos en ese tejido. Los marcadores usados eran queratina para tejidos portadores de epiteliales, CD45 para todos los tejidos linfoides y desmina para todos los músculos

65

cardíacos y esqueléticos. Cada tejido fue examinado a partir de tres donantes no relacionados. El método de tinción empleado era un método indirecto de 2 ó 3 fases, usando anticuerpos secundarios y terciarios junto con un complejo de avidina-biotina-peroxidasa. La actividad de peroxidasa endógena fue bloqueada usando peróxido de hidrógeno. Se bloqueó biotina endógena tratando todas las secciones de tejidos con una secuencia de avidina-biotina. Cuando se usó un anticuerpo terciario, todas las secciones de tejidos fueron tratadas con suero porcino normal, que inhibe la unión de anticuerpos terciarios a los tejidos. La validación del método de tinción inmunohistoquímica se determinó tiñendo sobre tejidos testigos positivos, la ausencia de testigos negativos y el efecto de fijación sobre la tinción de tejidos testigos. Se ensayó SC104 frente a 6 donantes de tumor de colon y uno de corazón a concentraciones de 0 ó 50 µg/ml. Los tejidos fueron fijados en acetona o formalina tamponada neutra. La formalina tamponada neutra se encontró que era el fijador óptimo. La concentración más baja de SC104 que proporcionó la máxima intensidad de tinción fue 1 µg/ml y esta concentración se usó para el trabajo posterior.

### Resultados

Se seleccionó SC104 para la unión de una gama de secciones de tejidos tumorales y normales congelados (Tabla 3). Hubo una tinción positiva del epitelio neoplástico del colon, endometrio, esófago, glándula salivar parótida y estómago y una tinción menos intenso de números pequeños de células epiteliales en tres de seis tumores de mamas. Se registró tinción positiva en el epitelio del intestino grueso normal, glándula salivar parótida, amígdalas y cuello uterino. Se registró una tinción menos intensa en números pequeños de células epiteliales transicionales en la vejiga urinaria, linfocitos tímicos dispersos de un único donante, células epiteliales glandulares de la piel, células epiteliales de la próstata, mamas y trompas de Falopio, células foliculares de ovarios, células de paredes alveolares del pulmón y números pequeños de células gliales del cerebro de un donante. El moco tiñó positivamente en el estómago y el intestino delgado. No se registró ninguna tinción específica en el corazón humano normal, riñón, placenta o el bazo. Estos resultados sugieren que el antígeno puede ser expresado en una gama de células epiteliales, pero que está predominantemente localizado en el tracto gastrointestinal. La inmunohistoquímica sugirió que el antígeno era expresado más fuertemente en tumores colorrectales que en tejidos normales adyacentes.

Tabla 3 - Inmuno-reactividad de anticuerpo SC104 con tumor congelado y secciones de tejidos normales

Tejido	Anti-EGF Mab	Unión a SC104	Comentarios sobre tinción
<b>Tumores</b>			
Pulmón	6/6	0	
Esófago	4/4	4/4	
Mamas	0	3/6	
Renal	ND	0	
Colon	3/8	8/8	
Ovarios	0	0	
Parótida	0	2/2	
Próstata	0	0	
Estómago	0	4/4	
Testículos	NH	0/1	
Endometrio	1/2	2/2	
<b>Tejidos normales</b>			
Cerebro	0	1/2	Número pequeño de células gliales dispersadas del cerebro de un donante
Mamas	3/3	2/3	Células epiteliales moderadamente dispersadas
Trompas de Falopio	0	2/3	Células epiteliales moderadamente dispersadas
Corazón	0	0	
Riñón	0	0	
Intestino grueso	3/3	3/3	Células epiteliales, mocos, difusos leves a moderados
Pulmón	0	2/3	Células de paredes alveolares un donante mínimas y un donante leves
Ovarios	0	3/3	Células foliculares dispersadas y leves
Placenta	3/3	0	
Próstata	3/3	3/3	Células epiteliales dispersadas y moderadas



Glándula salivar parótida	3/3	3/3	Moderada
Piel	3/3	2/3	Tinción mínima difusa
Intestino delgado	0	3/3	Moco superficial, mínimo difuso
Bazo	0	0	
Estómago	0	2/3	Moco superficial, difuso leve
Timo	0	3/3	Células epiteliales, corpúsculo de Hassall, membrana dispersada leve
Amígdalas	0	3/3	Epitelio queratinizado, membrana, dispersada leve a moderada
Vejiga urinaria	2/3	2/2	Epitelio transicional de células epiteliales, membrana dispersada leve
Cuello uterino	3/3	3/3	Células epiteliales, membrana, difusa a moderada

Notas : NH no hecho.

## EXPERIMENTO 2

### 5 Método

10 *Unión a líneas celulares tumorales mediante inmunofluorescencia indirecta y análisis citométrico de flujo.* Se volvieron a poner en suspensión células C170, Colo205, MKN45, R1D9 y 791T ( $10^5$ ) en 50  $\mu$ l de SC104 mab (0-20  $\mu$ g/ml) y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Después de lavar las muestras 3 veces en RPMI/10% de FCS las células fueron incubadas con anticuerpo anti-ratón de conejo marcado con FITC (1/50: Dako Ltd, Bucks, Reino Unido) e incubadas en hielo durante 30 minutos antes de un análisis en un dispositivo FACScan (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Los resultados se expresan en forma de fluorescencia lineal media (MLF).

15 *Unión a células tumorales mediante ensayo ELISA.* Se revistieron placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos con células a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/ml (100  $\mu$ l/pocillo) en suero bovino fetal al 10% en RPMI 1640. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire. Las células seguidamente se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,3, PBS) antes de ser fijadas con glutaraldehído al 0,5% en PBS (10 minutos, 25°C, 100  $\mu$ l/pocillo). Los sitios de unión no específica restantes fueron bloqueados mediante incubación durante 1 h con albúmina de suero bovino al 1% (fracción V de Sigma Chemicals Ltd.) en PBS. Las células se lavaron tres veces con una solución de lavado que consistía en 0,05% de Tween 20 en solución salina tamponada con fosfato. Las células se incubaron con SC104 (1  $\mu$ g/ml) durante 1 h a temperatura ambiente y seguidamente se detectó anticuerpo unido con peroxidasa de rabanillo anti-ratón de cabra y ABTS. Los resultados se expresan como absorbancia a 405 nm.

### 25 Resultados

30 Se realizó una caracterización adicional de la expresión de antígeno mediante ensayo ELISA en una gama de líneas celulares tumorales (figura 2a). El anticuerpo SC104 se unió predominantemente a líneas celulares de origen gastrointestinal. El SC104 se unió a células C170, Colo205 y R1D9 con una MLF de 1500 a 4.000.

## EXPERIMENTO 3

### Métodos

35 *Unión a tumor primaria.* Se obtuvieron muestras de tumores en el momento de la resección de cáncer colorrectal. Las muestras se desmenuzaron finamente y se desagregaron con colagenasa al 0,05% (tipo IV, Boehringer Mannheim, Lewes, Reino Unido) durante 20 minutos a 37°C. SE retiró la suspensión de células tumorales y se lavó 3 veces en solución salina equilibrada de Hanks (Gibco BRL, Paisley, reino Unido). Se añadió colagenasa de nueva aportación al tejido restante y se volvió a incubar durante 20 minutos adicionales. Este procedimiento se repitió dos veces antes de combinar las células de todas las disociaciones y se volvieron a poner en suspensión en medio de Dulbecco que contenía 20% de suero de ternera fetal (Gibco). Las células se incubaron durante 1 h a 4°C con SC104 mab (1  $\mu$ g). Las células se lavaron dos veces y se incubaron durante una hora adicional con inmunoglobulina anti-ratón de conejo conjugada a FITC (Dako Ltd. Bucks, Reino Unido). Se usó inmunoglobulina de ratón normal como testigo negativo y esta fluorescencia se sustrajo de la fluorescencia obtenida con SC104. Las células se lavaron 3 veces antes de un análisis en un dispositivo FACScan (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Los resultados se expresan como fluorescencia lineal media (MLF). La desagregación de tumores sólidos produce una población mixta de células que incluye glóbulos rojos, linfocitos, células estromales, macrófagos y células endoteliales. El porcentaje de células epiteliales se mide tiñendo citoqueratina mab Cam 5.2 y era de solamente  $22 \pm 13\%$  (intervalo 10-60). Sin embargo, a continuación de un control de la dispersión de la luz de ángulo directo para analizar selectivamente las células en el intervalo de tamaño de células malignas, un  $70 \pm 4\%$  (intervalo 69-86) de las células analizadas eran epiteliales. Además, La variación entre tumores se redujo considerablemente. El porcentaje de leucocitos medidos mediante tinción con en mab F-10-89 anti-CD45 en la población nucleada total era  $74 \pm 16$  (intervalo 40-90). Esta se

redijo considerablemente hasta 5,5±5% (intervalo 1-20) a continuación de un control FACS IV para tamaño maligno. El porcentaje de células estromales en la población de células analizadas en el intervalo de tamaño maligno era 3,5±3% (intervalo 1-12).

5 **Resultado**

El SC104 se mostró también que se une fuertemente a >80% de células tumorales colorrectales recientemente desagregadas con una densidad de antígenos media de  $4 \times 10^5$  antígenos por célula (intervalo  $1,5-10 \times 10^6$  antígenos por célula; figura 3).

10

EXPERIMENTO 4

**Método**

15 **Unión de extracto de membrana tumoral y normal.** Se produjeron extracciones extranucleares de membranas colónicas colorrectales y normales y se ensayó la unión de SC104 mediante ensayo ELISA.

**Resultados**

20 Para cuantificar adicionalmente la tinción diferencial obtenida mediante inmunohistoquímica, se produjeron preparaciones de membranas extracelulares de tumores colorrectales primarios y colon normal del margen de restricción. La tinción ELISA de estas membranas con SC104 puso de manifiesto una tinción débil del colon normal, mientras que se observó una tinción moderada a fuerte de las membranas tumorales, siendo la relación media T:N de 6:1 (Tabla 4).

25

Tabla 4 - Unión relativa de SC104 a extractos de membranas tumorales y normales

Paciente	Unión de SC104 mab a membranas extracelulares		
	Tumor colorrectal	Colon normal	Relación T:N
1	0,001	0,001	-
2	0,437	0,068	6,6:1
3	0,221	0,217	1:1
4	0,278	0,042	7:1
5	0,196	0,066	3:1
6	0,281	0,035	8:1
7	0,102	0,139	1:1

EXPERIMENTO 5

30 **Métodos**

35 **Unión a preparaciones de antígenos purificados.** El antígeno C 14 (glicoproteína de 140 KDa purificada a partir de saliva mediante cromatografía de afinidad en monoclonal C14), CEA (glicoproteína de 180 KDa purificada a partir de metástasis viva de tumor colorrectal mediante cromatografía de afinidad con 365 mab) y extracto glicolípido (glicolípido extraído en metanol-cloroformo 3:1 p/v a partir de tumores colorrectales) se secaron en placas de microtitulación mediante incubación durante una noche a 37°C. La unión de SC104 se ensayó mediante ensayo ELISA como se describió anteriormente.

40 El hapteno de Lewis<sup>y</sup> y el antígeno de grupo sanguíneo H tipo I y tipo II (Sigma, Poole, Dorset) se secaron en placas de microtitulación mediante incubación durante una noche a 37°C. La unión de SC104 mab se valoró mediante ensayo ELISA como se describió anteriormente.

**Resultados**

45 Para probar e identificar la naturaleza del antígeno reconocido por el anticuerpo SC104, se usó para teñir tres preparaciones de antígenos diferentes (figura 4). El primero era CEA, ya que es un antígeno bien conocido e inmunogénico expresado por tumores colorrectales. No se observó ninguna tinción significativa de CEA, aunque el anticuerpo anti-CEA mostró una buena reactividad, confirmando la presencia de antígeno funcional. La segunda preparación era una glicoproteína que expresa Lewis<sup>y/b</sup> extraída de saliva. Este antígeno es una glicoproteína de 90 KDa que porta una amplia gama de residuos de hidratos de carbono. El anticuerpo anti-Lewis<sup>y/b</sup> y el anticuerpo SC104 se unen ambos a esta glicoproteína, mientras que el anticuerpo anti-CEA no consigue unirse. Se obtuvo un resultado similar cuando se ensayó un extracto glicolípido tumoral en metanol/cloroformo. Estos resultados sugirieron que SC104

50

estaba reconociendo un residuo de hidrato de carbono expresado tanto en glicoproteínas como en glicolípidos y que puede estar reconociendo Lewis<sup>y/b</sup>. Para verificar si SC104 no se estaba uniendo a un antígeno de grupo sanguíneo, fue seleccionado en cuanto a la unión a Lewis<sup>y</sup>, haptenos de grupos sanguíneos H de tipo I y tipo II mediante ensayo ELISA (Tabla 5). El anticuerpo anti-H se unió fuertemente a la totalidad de los tres haptenos y el anticuerpo de Lewis<sup>y/b</sup> al hapteno de Lewis<sup>y</sup>, pero SC104 no consiguió reaccionar con ninguno de estos haptenos.

Tabla 5 - Unión de SC104 a antígenos de grupos sanguíneos

Unión de anticuerpos a antígenos de grupos sanguíneos medida mediante ELISA (OD 405 nm)			
Anticuerpo	Lewis <sup>y</sup>	Grupo sanguíneo H tipo I	Grupo sanguíneo H tipo II
SC104	0,057	0,087	0,076
Anti-H	2,058	2,174	1,331
Anti-Lewis <sup>y/b</sup>	0,662	0,129	0,097

#### Ejemplo 5 - Identificación de glicolípidos tumorales reconocido por anticuerpo monoclonal SC104

##### EXPERIMENTO 1

Optimización de extracción de lípidos y protocolos de inmunotinción

##### Métodos

*Extracción de lípidos as partir de células tumorales C170.* Se obtuvo un sedimento de células C170 (1 ml de volumen celular envasado) mediante tripsinización de un cultivo de tejidos adherente estático. El sedimento se lavó en PBS y el tampón en exceso se separó mediante aspiración a continuación de centrifugación y seguidamente se almacenó a -80°C. El sedimento se extrajo con cloroformo:metanol (3:1, v/v, 19 ml). La emulsión resultante se centrifugó a 8.000 rpm en un tubo de centrifugadora resistente a disolventes (Tefzel) de 50 ml durante 15 minutos a 4°C. La materia sobrenadante se secó usando un evaporador rotatorio a 30°C y se volvió a poner en suspensión en un volumen pequeño (~1 ml) de cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> al 0,5% (acuoso) (50:40:10).

*Análisis HPTLC de extractos lípidos.* La muestra se roció múltiples veces sobre una placa de HPTLC Merck y se reveló en cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> (acuoso) (50:40:10) como patrón. Las placas se secaron y seguidamente se colocaron en un depósito de vapor de yodo. Las bandas fueron marcadas a lápiz y de permitió que se evaporara el yodo de la placa durante una noche. Las placas seguidamente fueron inmunotefñidas con el fin de localizar el antígeno.

*Inmunotinción de placas de HPTLC reveladas.* Para la inmunotinción con SC104, las placas fueron sumergidas en poli(metilmetacrilato de isobutilo (solución al 0,1% p/v) hexano:cloroformo (9:1) durante 15 segundos y seguidamente se dejaron secar. Las placas seguidamente fueron bloqueadas en BSA al 3% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de incubación en solución de anticuerpo del ensayo (10 µg/ml) o solución de BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas seguidamente se lavaron tres veces en PBS/Tween-20 (0,1%), antes de ser incubadas en conjugado HRP anti-ratón de conejo de la empresa Dako (1/250 en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente las placas se lavaron tres veces en PBS/Tween-20 (0,1%) y una vez en Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0, Tween al 0,1% y se revelaron en reactivo BCIP/NBT Sigma-FAST.

*Tinción química de placas de HPTLC reveladas.* Se empleó tinción con orcinol para detectar la presencia de restos de hidratos de carbono. Las placas de HPTLC reveladas se dejaron secar antes de pulverizar con reactivo de orcinol hasta que quedaron completamente revestidas. Las placas se secaron en una corriente de aire caliente y se incubaron a 100°C durante 15 minutos. Se usó tinción con ninhidrina para detectar moléculas que contenían grupos amino libres. La placa de HPTLC revelada se dejó secar primero y seguidamente se sumergió en solución de ninhidrina (ninhidrina al 0,25% p/v en acetona) hasta que se humedecieron completamente. La placa se dejó seguidamente revelar a temperatura ambiente durante varias horas.

##### Resultados

El antígeno se encontró que era satisfactoriamente extraído en mezcla 3:1 de cloroformo:metanol, sin cambios en el número de bandas detectadas en comparación con la extracción con disolvente 2:1 original. Sin embargo, un aumento del disolvente hasta 4:1 de cloroformo:metanol parece que redujo el número de bandas detectadas mediante HPTLC y, consecuentemente, no fue empleado para fines de extracción. Experimentos de inmunotinción tempranos emplearon también una incubación de 60 segundos de la placa de HPTLC en poli(metacrilato de isobutilo) al 0,1% p/v en hexano; sin embargo, se encontró que era necesario reducir esta hasta 15 segundos para proporcionar una detección reproducible del antígeno. Finalmente, se encontró necesario incorporar un lavado exento de fosfatos de las placas de HPTLC antes de una incubación con el sustrato de fosfatasa para asegurar una sensibilidad máxima.

Los experimentos de SDS-PAGE y de transferencia Western han mostrado previamente que el antígeno SC104 podría ser detectado en el extracto celular completo, el lisado celular y el sedimento insoluble producidos durante la preparación de membrana celular. Sin embargo, el antígeno no fue detectado en la propia preparación de la membrana celular. Además, la separación por HPTLC e inmunotinción del sedimento insoluble producido en la preparación de la membrana fue capaz también de detectar el antígeno. Esto sugiere que el antígeno es un lípido o una proteína muy hidrófoba.

## EXPERIMENTO 2

Análisis de fracción que contiene antígeno mediante cromatografía de columna de sílice

### Métodos

**Fraccionamiento en columna de sílice de extracto lípido.** Una columna de gravedad (150 mm d.i.) fue rellena con una suspensión de sílice en cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> al 0,5% (acuoso) (50:40:10). El extracto de C170 nuevamente disuelto en ~1 ml de cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> al 0,5% (acuoso) (50:40:10) se introdujo en la columna y se eluyó usando las mismas condiciones de disolventes. Se recogieron fracciones y se analizaron mediante HPTLC. Se empleó una inmunotinción con SC104 para localizar el antígeno y se usaron métodos de tinción química para caracterizar adicionalmente la fracción.

**Digestión con ceramida glicanasa de antígeno.** Se usó una digestión de ceramida glicanasa para liberar oligosacáridos a partir de moléculas de glicolípidos. La solución de antígeno en acetato de sodio 50 mM, pH 5,0, colato de sodio al 0,1% p/v se mezcló con solución de ceramida glicanasa (1 µl para 50 µl de antígeno) y se incubó a 37°C durante 3 horas. El lípido des-glicosilado se separó de los oligosacáridos liberados mezclando con 250 µl de cloroformo:metanol (2:1) seguido de centrifugación breve. La fase acuosa superior se separó de la fase orgánica inferior y las dos se secaron separadamente.

### Resultados

Un fraccionamiento a pequeña escala de extracto lípido de C170 (obtenido a partir de ~0,5 ml de volumen celular relleno) se demostró en una columna de sílice de volumen de lecho de µ10 ml usando 50:40:10 de cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> (0,5% p/v en solución acuosa) como la fase móvil. Sin embargo, con el fin de permitir la caracterización del antígeno, fue necesario llevar a escala este método. Esto se mostró que era posible usando ~10 ml de volumen celular relleno para obtener el extracto lípido y aumentar el volumen de la columna hasta ~36 ml.

Se introdujo extracto lípido completo en la columna a escala, se recogieron fracciones y la fracción que contenía antígeno se detectó mediante inmunotinción (figura 5). Se detectó un antígeno con R<sub>F</sub> de 0,53. Se usaron seguidamente HPTLC y tinción química para caracterizar adicionalmente esta fracción. Se usó intencionalmente HPTLC para detectar el resto de hidratos de carbono de glicolípidos. Este puso de manifiesto tres bandas con valores de R<sub>F</sub> entre 0,50 y 0,61 y parecía que correspondían al valor inicial de R<sub>F</sub> del antígeno. Sin embargo, una inmunotinción repetida de forma simultánea con tinción con orcinol puso de manifiesto un desplazamiento inusual en el R<sub>F</sub> del antígeno, con 3 bandas detectadas entre R<sub>F</sub> 0,36 y 0,39 (figura 6). Esto puede sugerir que las bandas detectadas mediante orcinol no corresponden al antígeno, sino que representan contaminantes glicolípidos.

Con el fin de determinar si este antígeno era una proteína, la fracción fue analizada mediante SDS-PAGE y transferencia Western. Una tinción con plata del gel puso de manifiesto niveles muy bajos de contaminación de proteínas; sin embargo, la transferencia Western no consiguió detectar específicamente ningún antígeno en la preparación, sugiriendo que el propio antígeno no es una proteína.

Una parte alícuota de la fracción que contiene el antígeno fue digerida con ceramida glicanasa para separar los hidratos de carbono. Los glicanos fueron separados de la parte lípida usando 2:1 de cloroformo:metanol; con los glicanos libres previstos para una partición con el metanol y los lípidos des-glicosilados con el cloroformo. Seguidamente se realizaron técnicas de inmunotinción y tinción química sobre placas de HPTLC sobre glicolípido intacto y lípido des-glicosilado. La inmunotinción puso de manifiesto la presencia de antígeno (R<sub>F</sub> 0,38-0,46) con el glicolípido intacto y lípido no des-glicosilado (figura 7). Sin embargo, experimentos posteriores demostraron que la división en partes del antígeno sin digerir es altamente variable, siendo detectado a veces el antígeno en las fases acuosa, orgánica o en ambas. Por tanto, el fallo en detectar antígeno en una fracción orgánica tratada con ceramida glicanasa es dudoso. Puede ser debido a la división en partes del antígeno en la fase acuosa, en lugar de a la separación de ceramida glicanasa del antígeno.

Con el fin de confirmar el experimento anterior, se repitió con las fases orgánica y acuosa siendo analizadas a continuación de la digestión. El análisis de las muestras mediante HPTLC y tinción con yodo demostró una pérdida de unión de SC104 en ambas fracciones a continuación de la separación de oligosacárido (figura 8). Esto indica que el SC104 reconoce un glicolípido intacto y que este reconocimiento se pierde a continuación de la separación de oligosacáridos.

Los fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, fosfatidil-serina y los grupos liso relacionados tiene grupos amino libres que pueden ser detectados mediante tinción con ninhidrina. La tinción con HPTLC y ninhidrina del glicolípido intacto y la fracción tratada ceramida glicanasa pusieron de manifiesto la presencia de fosfolípidos con valores de  $R_F$  entre 0,51 y 0,54. Sin embargo, esto puede ser un contaminante que se desplaza conjuntamente con el antígeno, particularmente en cuanto la bibliografía sugiere que la co-elución de fosfolípidos y glicolípidos es un problema común cuando se emplea un método de purificación de columna de sílice única. Esto indica que este método puede ser insuficiente para resolver el antígeno del extracto completo con pureza suficiente para facilitar la caracterización.

## 10 EXPERIMENTO 3

Fraccionamiento de extracto de lípido completo en subgrupos lípidos y localización de antígeno

### 15 *Métodos*

Se extrajo lípido a partir de células C170 de volumen celular relleno de ~2 ml como se describió anteriormente. A continuación de la evaporación, el extracto se volvió a poner en suspensión en ~1 ml de cloroformo. Se preparó una columna de sílice con un volumen de lecho de 10 ml (150 mm d.i.) en cloroformo al 100%. La muestra fue añadida a la columna y la columna se lavó bajo gravedad en los siguientes disolventes: 10 volúmenes de columna de cloroformo, para eluir lípidos simples; 40 volúmenes de columna de acetona, para eluir glicolípidos neutros; 10 volúmenes de columna de metanol, para eluir gangliósidos y fosfolípidos. Las fracciones se recogieron y se secaron a través de evaporación rotatoria y se almacenaron a 4°C antes del análisis.

*Digestión con neuraminidasa de antígeno.* Se combinó solución de antígeno (5  $\mu$ l) con 5  $\mu$ l de 10 x solución tamponante, provista con la neuraminidasa, y 10  $\mu$ l de solución de neuraminidasa. El volumen final se llevó hasta 50  $\mu$ l, se mezcló y se incubó a 37°C durante 1 h.

*Desialilación química mediante hidrólisis ácida.* Se calentó solución de antígeno en ácido sulfúrico 0,05 M a 80°C durante 2 horas. La muestra seguidamente se dejó enfriar y se almacenó a 4°C antes del análisis.

### 30 *Resultados*

Con el fin de separar glicolípidos de fosfolípidos, una columna de sílice de 10 ml fue equilibrada con cloroformo. Se obtuvo extracto lípido de C170 completo a partir de  $\mu$  ml de volumen celular relleno. Este se aplicó a la columna y la columna se lavó con cloroformo, para eluir lípidos simples; acetona, para eluir glicolípidos y finalmente metanol para eluir fosfolípidos.

Una separación por HPTLC e inmunotinción detectaron al menos tres bandas de antígenos en el extracto completo y fracción de fosfolípidos ( $R_F$  0,54, 0,51 y 0,41) junto con una única banda en la fracción lípida simple ( $R_F$  0,51; figura 9). Sin embargo, no se detectó ningún antígeno en la fracción de glicolípidos. Una tinción con ninhidrina puso de manifiesto la presencia de fosfolípido en el extracto completo y la fracción de fosfolípidos solamente. Sin embargo, una tinción con orcinol demostró que los glicolípidos estaban presentes en las fracciones de glicolípidos y fosfolípidos. Significativamente, se observaron dos bandas distintas en la fracción de fosfolípidos ( $R_F$  0,54 y 0,51) que parecía que se desplazaban conjuntamente con el antígeno, indicando nuevamente que el antígeno puede portar restos de hidratos de carbono.

Una lectura adicional indicó que, aunque el método anterior puede ser usado para separar glicolípidos neutros de fosfolípidos, los glicolípidos sialilados eluyen conjuntamente con fosfolípidos. Esto, junto con el desplazamiento conjunto del antígeno y las bandas positivas de orcinol, proporcionaron alguna evidencia de que el antígeno puede ser un glicolípido sialilado; mientras que la ausencia de antígeno en la fracción de glicolípido neutro sugiere que el glicolípido debe estar sialilado con el fin de ser reconocido por SC104.

Una evidencia adicional de que el antígeno es un glicolípido sialilado y no un fosfolípido se obtuvo separando extracto lípido completo usando 2D HPTLC y analizando las placas a través de inmunotinción y tinción química. En la primera dimensión, la placa de HPTLC fue revelada en el patrón 50:40:10 de la mezcla disolvente cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub>. La placa seguidamente se dejó secar, se rotó 0° y se reveló en cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua 10:4:2:2:1. Una inmunotinción puso de manifiesto que se produjo muy poco desplazamiento del antígeno en la segunda dimensión (figura 10). Esto demostró nuevamente que el antígeno no es un glicolípido neutro, ya que los glicolípidos neutros se desplazan en acetona. Una tinción con orcinol de hidratos de carbono mostró nuevamente una banda que se desplazaba conjuntamente con el antígeno en las dos dimensiones, mientras que la tinción con ninhidrina de los grupos amino demostró un compuesto que se desplazaba conjuntamente en la primera dimensión pero que se separaba seguidamente del antígeno en la segunda dimensión.

Se usó una digestión con neuroaminidasa para detectar el efecto de la separación de ácido siálico en el reconocimiento del antígeno. Una inmunotinción de muestra de fosfolípidos (gangliósidos separados por HPTLC antes y después del tratamiento con neuraminidasa proporcionó dos agrupaciones de bandas, con una agrupación

más polar a  $R_F$  0,46 y una menos polar a  $R_F$  0,62 (figura 11). Aunque se detectaron las mismas bandas antes y después del tratamiento con neuraminidasa, hubo un desplazamiento de la intensidad en el perfil de tinción. El tratamiento con neuraminidasa produjo una tinción más intensa en la agrupación de  $R_F$  0,46 y una disminución de la intensidad en la agrupación de  $R_F$  0,62 en comparación con el testigo sin tratar. Esto sugiere que, aunque la separación de ácido siálico fue solamente parcial, como las condiciones no habían sido optimizadas, la separación de ácidos siálicos de la agrupación de  $R_F$  0,62 más polar condujo a la formación de menos agrupaciones polares de moléculas, que son todavía detectadas por el anticuerpo. Como las bandas menos polares detectadas después de la digestión parcial con neuraminidasa se desplazaban conjuntamente con las bandas menos polares en la fracción sin tratar de glicolípidos/fosfolípido, se supone que esta agrupación se debe corresponder en sí misma con una forma sialilada, probablemente monosialilada, mientras que la agrupación más polar corresponde a una forma disialilada.

Se empleó seguidamente una cromatografía de columna de sílice para fraccionar glicolípidos diferencialmente sialilados. Se introdujo una muestra de extracto lípido en la columna y las fracciones se eluyeron para obtener el lípido simple (cloroformo), glicolípidos sialilados y fosfolípidos (cloroformo:acetona:ácido acético:agua 52:8:8:18:4, seguido de cloroformo:metanol 4:1); glicolípidos monosialilados (cloroformo:metanol 2:3); glicolípidos disialilados (cloroformo:metanol:agua 65:25:4) y finalmente glicolípidos polisialilados (cloroformo:metanol:agua 60:35:8). Las fracciones seguidamente se secaron y se analizaron mediante HPTLC seguida de inmunotinción y tinción química (figura 12).

La tinción con orcinol y ninhidrina mostró que estaban presentes tanto fosfolípidos como glicolípidos en las fracciones de glicolípidos sialilados. Sin embargo, en el antígeno nuevamente parece que se desplaza conjuntamente solamente con los glicolípidos positivos a orcinol, y no con los fosfolípidos positivos a ninhidrina.

Una HPTLC e inmunotinción de estas muestras puso de manifiesto tres agrupaciones de antígeno en el extracto completo ( $R_F$  ~0,49, ~0,38 y ~0,24), en que la más polar de éstas mostraba solamente una tinción muy borrosa. No se observó antígeno en la fracción lípida simple de la fracción de fosfolípido/glicolípido neutro, pero se detectó antígeno en las fracciones sialiladas. Esto confirma que el antígeno es un glicolípido sialilado y no un fosfolípido. Dos de las agrupaciones de bandas fueron detectadas en la fracción monosialilada ( $R_F$  ~ 0,49 y  $R_F$  ~0,38). En la fracción disialilada, es visible una tinción borrosa para las agrupaciones más ( $R_F$  ~0,24) y menos ( $R_F$  ~0,49) polares, siendo detectada la tinción más intensa para la agrupación media ( $R_F$  ~0,38). En la fracción polisialilada, son visibles dos agrupaciones ( $R_F$  ~ 0,38 y  $R_F$  ~ 0,24). Esto sugiere que la agrupación menos polar es monosialilada, la agrupación media representa estructuras disialiladas y la agrupación más polar tiene tres o posiblemente cuatro ácidos siálicos.

Se usó seguidamente una hidrólisis ácida para desialilar químicamente el antígeno. Este método es más agresivo que los procedimientos enzimáticos y es más probable que de lugar a una separación completa de ácidos siálicos. La HPTLC y la inmunotinción con SC104 demostraron que la separación química de ácidos siálicos dio lugar a la pérdida completa de la unión de SC104, proporcionando una evidencia adicional de que la sialilación del antígeno es necesaria para la unión al anticuerpo.

Por lo tanto, parece que el SC104 se une a un glicolípido mono-, di- e incluso poli-sialilado. Sin embargo, no se une a una forma asialo. Esto indica que el antígeno debe ser monosialilado, sin embargo, la presencia de ácidos siálicos adicionales no afecta a la unión de SC104. La intensidad aumentada de la tinción para la forma disialilada sugiere también que, a pesar de que solo requiere la presencia de un ácido siálico, el antígeno se encuentra lo más comúnmente que porta dos ácidos siálicos. Sin embargo, actualmente no está claro si esto es dependiente de la edad y condiciones de cultivo de las células de C170 antes de la recolección.

#### EXPERIMENTO 4

Comparación de antígeno con patrones lípidos disponibles en el comercio

##### *Métodos*

El antígeno SC104 ha sido comparado con un cierto número de patrones lípidos disponibles en el comercio. Ejemplos de estos patrones se rociaron sobre placas de HPTLC y se revelaron en 50:40:10 de cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> (0,5% p/v). Las placas fueron rociadas también con antígeno SC104 parcialmente purificado. El desplazamiento de cada patrón fue detectado mediante tinción con vapor de yodo y la ubicación de cada uno fue marcada en la placa. Las placas seguidamente fueron sondadas con SC104. Se observó que ninguno de los patrones fue reconocido por SC104, sugiriendo que ninguno de los patrones representa el antígeno.

##### *Resultados*

Los valores de  $R_F$  obtenidos para los patrones se muestran en la Tabla 6 siguiente. Estos valores fueron comparados también con una gama de valores de  $R_F$  obtenidos para el antígeno SC104 variablemente sialilado, recogido en la lista con el fin de aumentar la polaridad y grado de sialilación.

Tabla 6

Patrón	Estructura	R <sub>F</sub>	SC104 R <sub>F</sub>
Lactosil-ceramida	Glc-β1,1-Cer	0,79	
Globotriaosil-ceramida (Gb3)	Gal-α1,4Gal-β1,4Glc-β1,1-Cer	0,71	
Globotetraosil-ceramida (Globósido)	GalNAc-β1,3Gal-α1,4Gal-β1,4Glc-β1,1-Cer	0,62	
Globopentaosil-ceramida (Forssman)	GalNAc-α1,3GalNAc-β1,3Gal-α1,4Gal-β1,4Glc-β1,1-Cer	0,56	
GM3	NeuAc-Galβ1,4-Glc-β1,1-Cer	0,53	0,53
			0,49
AGM1	Galβ1,3-GalNAc-β1,4-Gal β1,4Glc-β1,1-Cer	0,48	
GM1	Galβ1,3-GalNAc-β1,4-(NeuAc)Gal β1,4Glc-β1,1-Cer	0,39	0,39
			0,36
GD3	NeuAc-NeuAc-Gal β1,4Glc-β1,1-Cer	0,33	
			< 0,24
GD1a	NeuAc-Galβ1,3-GalNAc-β1,4-(NeuAc)Gal β1,4Glc-β1,1-Cer	0,22	
GD1b	Galβ1,3-GalNAc-β1,4-(NeuAc-NeuAc)Galβ1,4Glc-β1,1-Cer	0,16	
GT1b	NeuAc-Galβ1,3-GalNAc-β1,4-(NeuAc-NeuAc)Galβ1,4Glc-β1,1-Cer	0,08	

Se puede observar que el antígeno SC104 menos polar se desplaza conjuntamente con GM3, mientras que las moléculas más polares se desplazan con valores de R<sub>F</sub> similares a GD1a y GD1b. Sin embargo, en todos estos casos los patrones en sí mismos no fueron reconocidos.

El desplazamiento del antígeno con valores de R<sub>F</sub> que sean comparables a muchos de los gangliósidos estándar sugiere que, junto con el requisito de sialilación, el antígeno tiene una cadena principal de oligosacáridos neutros cortos que consiste en tres o cuatro monosacáridos. Lo más probable es que esto sea realmente una estructura de tetraosilo, ya que esto permitiría más fácilmente una sialilación múltiple. El antígeno menos polar que es detectado es probablemente una estructura de antígeno parcial, que consiste en una cadena principal de oligosacáridos más corta.

#### Ejemplo 6 - Identificación de glicoproteína tumoral reconocida por SC104 mab

##### EXPERIMENTO 1

###### *Métodos*

*Purificación y caracterización de antígeno SC104.* Se purificó antígeno específico SC104 a partir de muestras de esputo mezcladas en una relación 1:1 con Tris 0,5% NP40, pH 7,6, 0,1 M. Brevemente, la inmuno-afinidad fue producida reticulando SC104 S136A para proteína A C1-6B sefarosa usando pimelidimato de dimetilo-2 HCl como conector covalente.

###### *Resultados*

Debe apreciarse que, aunque el antígeno se observó que tenía una reacción cruzada con SC104 (figura 13a), no tuvo reacción cruzada con un anticuerpo de Lewis<sup>a</sup> o 19/9.

##### EXPERIMENTO 2

###### *Métodos*

*Identificación de secuencias del antígeno SC104.* Se purificó antígeno específico SC104 a partir de esputo, como se indicó en el experimento 1 anterior, y las muestras se sometieron a SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con plata siguiendo las recomendaciones de los proveedores (estuche de ensayo de tinción de Bio-Rad Silver, número de catálogo 1610443). La banda de interés fue posteriormente sometida a análisis MALDI.

###### *Resultados*

Una banda para el antígeno SC104 entre 50-75 kDa fue identificada en un gel teñido con plata (figura 14). El análisis de secuencias MALDI sugirió diversos posibles coincidencias que incluye:

P04839 GP91-PHOX (BP91-1) (glicoproteína de membrana de unión Heme)

Q99741 Homólogo de proteína 6 de control de división celular (proteína relacionada a CDC6)

5

Q14451 Proteína 7 unida a receptor de factor de crecimiento (proteína adaptadora GRB7)

P14618 Piruvato quinasa, isozimas M1/M2 /EC 2.7.1.40) (isozima muscular de piruvato quinasa)

10

096013 Proteína quinasa PAK 4 de serina/treonina (EC 2.7.1.37) (quinasa 4 activada por p21)

P01833 (Receptor de Ig polímero)

15

Como el SC104 reconoce un hidrato de carbono, estos resultados sugieren que el azúcar de sialiltetraosilo puede ser expresado también sobre estas glicoproteínas.

### EXPERIMENTO 3

#### Método

20

*Ensayos de competición usando el antígeno inmuno-purificado que usa la columna de sefrosa de proteína A de SC104.* La fracción purificada de SC104 se usó como un competidor para SC104 que se une a células C170 usando experimentos basados en la técnica ELISA (figura 15). Placas de microtitulación fueron revestidas con  $5 \times 10^4$ /pocillo de C170s, las células se fijaron y bloquearon antes de ser incubadas con soluciones de anticuerpo biotinilado (0,1  $\mu\text{g}$ /pocillo) mezclado con una relación creciente de antígeno. En anticuerpo biotinilado SC104 unido fue detectado mediante SA-HRP y TMB. Los resultados se expresan como absorbancia a 650 nm.

25

#### Resultados

30

El antígeno SC104 inmuno-purificado que usa la columna de inmuno-afinidad de sefrosa CI-6B de proteína A ha demostrado su capacidad para inhibir específicamente la unión del anticuerpo a su diana.

#### Ejemplo 7 - SC104 induce directamente la destrucción de células tumorales

35

### EXPERIMENTO 1

#### Métodos

40

*Anexina/PI.* Las células tumorales (partes alícuotas de  $1 \times 10^5$ ) en suspensión incubadas con anticuerpo SC104 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o testigos apropiados durante 4 h a temperatura ambiente y seguidamente pudieron ser teñidos también con anexina marcada con IFITC y yoduro de propidio (Sigma, Poole, Dorset) y seguidamente fueron analizadas mediante citometría de flujo de color dual.

45

#### Resultados

50

Este estudio ha mostrado una fuerte tinción de tumores colorrectales recientemente desagregados. Sin embargo, durante estos estudios se observó que el anticuerpo SC104 parece que aceleraba la muerte de células tumorales. Se observó un fenómeno similar cuando se pusieron en suspensión líneas celulares tumorales crecidas normalmente en forma de monocapas adherentes y se teñieron con anticuerpos SC104 para análisis citométrico de flujo. Para determinar si el anticuerpo estaba induciendo apoptosis o necrosis, las células expuestas a anticuerpo SC104 fueron contrateñidas con anexina y yoduro de propidio (figura 16). Menos de 25% de las células teñidas con el anticuerpo testigo mostraron tinción con anexina o yoduro de propidio. Por el contrario, las células expuestas a una concentración mayor que 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de SC104 mostraron una tinción fuerte con un 30% de células que se teñían con anexina, 75% con IP y 65% con ambos. Las células teñidas con anexina sola se describen como en las fases tempranas de apoptosis, mientras que las células teñidas con anexina y IP están apoptosis/necrosis de fase tardía.

55

### EXPERIMENTO 2

60

#### Método

*Activación de pan caspasa.* Se expusieron  $2 \times 10^5$  células C170 colorrectales a 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de SC104 durante hasta 6 horas y se empleó pan caspasa FITC-FMK-vad (caspACE FITC-vad-FMK, Promega, número de catálogo G7462) para establecer la activación de caspasa. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. Los testigos indujeron un anticuerpo de mürido testigo negativo y un anticuerpo Fas a 100 ng/ml.

65



*Resultados*

Los resultados del ensayo demuestran que SC104 activa pan caspasas después de 5 horas (figura 17).

## 5 EXPERIMENTO 3

*Métodos*

10 *Activación de caspasa 6 mediante SC104 mab.* Se expusieron  $2 \times 10^5$  células C170 colorrectales a 1-100  $\mu\text{g/ml}$  de SC104 durante 6 horas y se generaron lisados celulares. Los lisados se sometieron posteriormente a SDS-PAGE al 12%, transferencia Western y fueron sondados con un anticuerpo específico para caspasa 6 (anticuerpo de caspasa 6 escindido, Cell Signallin Technology (NEB), número de catálogo 9761). Las células expuestas a SC101 fueron incluidas como un testigo negativo.

15 *Resultados*

El revelado de la transferencia Western (figura 18) demuestra claramente que hay una activación de caspasa 6 en las células C170 expuestas a 10 y más intensamente a 100  $\mu\text{g/ml}$  de SC104 mab. Las células sometidas a tratamiento con el SC101 mab no mostraron activación de caspasa 6.

## 20 EXPERIMENTO 4

*Métodos*

25 *Inhibición de muerte celular de SC104 usando el inhibidor de caspasa z-FMK-vad.*  $2 \times 10^5$  células C170 se sometieron a 3  $\mu\text{g/ml}$  de SC104 y la mitad también se incubaron con 3  $\mu\text{M}$  de inhibidor de z-FMK-vad (Promega, número de catálogo G7232) y se incubaron durante una noche. Al día siguiente se ensayó la viabilidad celular usando anexina V FITC y yoduro de propidio.

30 *Resultados*

Hubo un aumento de 23% en células viables en presencia del inhibidor (figura 19), proporcionando una fuerte indicación de que el SC104 destruye células colorrectales mediante una trayectoria apoptótica "clásica".

## 35 EXPERIMENTO 5

*Métodos*

40 *Inhibición del crecimiento celular.* Se dividieron en partes alícuotas  $1 \times 10^3$  células colorrectales C170, C168, C146, CaCO2, Colo205, LoVo y HT29 en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos de fondo liso y se dejaron adherir durante una noche a 37°C. Al día siguiente las células fueron tratadas con: 10, 3, 1, 0,3 y 0  $\mu\text{g/ml}$  de SC104 mab. Como testigo negativo 791T/36 a concentraciones de 30, 10, 3 y 0  $\mu\text{g/ml}$  fue titulado frente a cada concentración de fármaco usada. Se usaron pocillos por triplicado. Las células se dejaron durante 5 días a 37°C antes de la adición del reactivo MTS a cada pocillo y la lectura de la densidad óptica a 490 nm.

45 *Resultados*

El efecto de SC104 sobre la proliferación de células adherentes se midió en un ensayo MTS. Todas las concentraciones en exceso de SC104, pero no anticuerpo testigo, inhibieron el crecimiento de la línea celular tumoral colorrectal C170 y Colo205 pero no HT29 o LoVo (figura 20). La figura 21 demuestra que la  $\text{IC}_{50}$  se ajusta para las líneas celulares tumorales C170, Colo205, HT29 y LoVo. Se obtuvieron resultados análogos con otras líneas celulares tumorales de mamas y colorrectales (Tabla 7). Estos resultados sugirieron que SC104 estaba inhibiendo la proliferación de células tumorales induciendo apoptosis a dosis elevadas. Sin embargo, las células en suspensión que habían perdido su contacto célula/célula fueron sensibilizadas a una muerte celular rápida a 55 concentraciones inferiores de anticuerpos.

Tabla 7 - SC104 inhibe el crecimiento celular

Línea celular	% inhibición de crecimiento celular medido mediante tinción con MTS	
	SC104 (30 µg/ml)	791T/36 (30 µg/ml)
C170	70	10
C146	65	6
C168	55	3
CaCO2	20	2
Colo205	55	5
HT-29	5	5

## EXPERIMENTO 3 - UNIÓN HOMOFÍLICA

5 *Métodos*

*FACS sobre células recientes y fijadas.* Células C170 ( $10^5$ ) recientes o fijadas con glutaraldehído al 0,5% durante 1 h se volvieron a poner en suspensión en 100 µl de SC104 mab (0-100 µg/ml) y se incubaron en hielo durante 1 h. Después de lavar las muestras 3 veces en RPMI/10% FCS las células se incubaron con anticuerpo anti-ratón de conejo marcado con FITC (1/10: Dako Ltd, Bucks, Reino Unido) y se incubaron en hielo durante 30 minutos antes de analizar mediante FACS como se describió anteriormente.

*ELISA para unión homofílica.* Se usaron placas ELISA de 96 pocillos Falt flexi revestida con anticuerpo específico IgG Fc anti-ratón o se revistieron con 3 µg/ml (100 µg/pocillo) de antígeno C14 en PBS y se secaron durante una noche. Las placas se lavaron 3 veces con PBS antes de bloquear con PBS/1% BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió anticuerpo SC104 (0-100 µg/ml) sobre hielo durante 1 hora. Después de lavar la placa 3 veces en PBS/0,05% Tween-20, se añadió SC104 biotinilado y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después de 3 lavados adicionales en PBS, se añadió anti-ratón SA-HRP en Tween-20 al 0,05% (1/1000; Dako, High Wycombe, Reino Unido) o Fc anti-ratón de cabra (1/1000: Dako, High Wycombe, Reino Unido) en la medida apropiada y se dejó en hielo durante 30 minutos. Las placas se lavaron 5 veces en PBS/Tween-20 al 0,05% antes de añadir 100 µl/pocillo de sustrato TMB y realizar la lectura a 570 nm.

*Resultados*

El número de haptenos SC104 en la superficie de células tumorales C170 es aproximadamente  $4 \times 10^5$  sitios por célula. Sin embargo, este número de antígenos sería fácilmente saturado a 1 µg/ml de SC104. Por lo tanto, era difícil explicar por qué se requería un exceso de 10 veces para la destrucción celular. Podría ser que tras la unión del anticuerpo se revelaban más sitios de unión. Por lo tanto, se generaron curvas de saturación de anticuerpos sobre células recientes y fijadas. El antígeno no estaba saturado incluso a una concentración de SC104 de 100 µg/ml y las curvas fueron similares sobre células recientes y fijadas, haciendo improbable que se estuviera revelando antígeno adicional (figura 22). Estos resultados son similares a los datos previamente descritos sobre R24, un mab de ratón que reconoce GD3 gangliósido. Este anticuerpo muestra una unión de anticuerpo no saturable y en una serie de experimentos complejos se mostró que era un anticuerpo de unión homofílica con la capacidad de unirse a un antígeno y a sí mismo (resultados no mostrados). Por lo tanto, SC104 fue seleccionado en cuanto a la capacidad de unirse a sí mismo revistiendo una placa ELISA con SC104 sin marcar y midiendo la unión de SC104 a biotina HRP-avidina. El SC104 no se unió a sí mismo (figura 23), sin embargo cuando fue purificado se usaron haptenos purificados de SC104 que expresan glicoproteína para revestir las placas, el SC104 se unió estequiométricamente hasta 10 µg/ml y seguidamente se unió exponencialmente más allá de esta concentración (figura 23). Estos resultados sugieren que a bajas concentraciones de anticuerpo, el anticuerpo se une a antígeno pero a concentraciones elevadas el anticuerpo unido al antígeno se puede unir también a anticuerpo adicional. Esto puede aumentar enormemente la avidéz funcional de los anticuerpos, conduciendo a retículos de anticuerpos que se constituyen sobre las células con una elevada densidad de antígeno. Esta formación de retículos podría dar lugar a múltiples señales que dan lugar a apoptosis a concentraciones elevadas de anticuerpo.

## 45 EXPERIMENTO 4 - INHIBICIÓN IN VITRO DEL CRECIMIENTO CELULAR EN COMBINACIÓN CON FÁRMACOS CITOTÓXICOS

Se dividieron en partes alícuotas  $1 \times 10^3$  células C170 colorrectales en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos de fondo liso y se dejaron adherir durante una noche a 37°C. al día siguientes las células fueron tratadas con cisplatino, mitomicina C, oxaliplatino y tamoxifeno a concentraciones finales de 10, 3, 1, 0,3, 0,1 y 0 µM. Como testigo negativo 791T/36 a concentraciones de 100, 30, 10, 3 y 0 µg/ml fue titulado frente a cada concentración de fármaco usada. Se usaron pocillos por duplicado. Las células se dejaron durante 5 días a 37°C antes de la adición del reactivo MTS a cada pocillo y efectuar la lectura de la densidad óptica a 490 nm.

### Resultados

La capacidad de SC104 para mostrar una destrucción aditiva con agentes quimioterapéuticos fue seleccionado en ensayos MTS *in vitro*. Todos los fármacos fueron titulados entre (0,1-10 µg/ml) en presencia de SC104 o anticuerpo testigo (0,3-100 µg/ml). La figura 24 muestra un experimento representativo para células tratadas con una combinación de SC104 y 5-FU. La figura 25 resume los resultados que muestran que SC104 muestra una destrucción aditiva con cisplatino, mitomicina C, 5-FU y tamoxifeno. No se observó ningún efecto aditivo con oxaliplatino.

### EXPERIMENTO 5 - INHIBICIÓN IN VIVO DE CRECIMIENTO CELULAR TUMORAL EN COMBINACIÓN CON FÁRMACOS CITOTÓXICOS

#### Métodos

**Modelo de prevención.** La línea celular tumoral colorrectal, C170, fue mantenida en paso en serie en ratones desprovistos de sistema inmune. Para la terapia, los ratones fueron sacrificados y los tumores extirpados. El tumor fue cortado en láminas finas y se implantaron trozos de 3 mm<sup>2</sup>, bajo anestesia, por vía subcutánea, en 30 ratones machos que habían sido ubicados al azar en 4 grupos experimentales.

Los ratones fueron explantados con trozos de 3 mm<sup>3</sup> de xenoinjertos C170. Los grupos de ratones fueron tratados con 5-FU/leucovorina. El tamaño del tumor se midió mediante calibradores y el área de sección transversal del tumor se calculó los días 7, 9, 12, 14 y 16. Los animales se pesaron para valorar la toxicidad del tratamiento. A la terminación del experimento, los tumores se pesaron para valorar la eficacia anti-tumoral.

**Modelo terapéutico.** La línea celular tumoral colorrectal, C170, fue mantenida en paso en serie en ratones desprovistos de sistema inmune. Para la terapia, los ratones fueron sacrificados y los tumores extirpados. El tumor fue cortado en láminas finas y se implantaron trozos de 3 mm<sup>2</sup>, bajo anestesia, por vía subcutánea en 30 ratones machos que habían sido ubicados al azar en 4 grupos experimentales.

Los ratones fueron explantados con trozos de 3 mm<sup>3</sup> de xenoinjertos C170. Los grupos de ratones fueron tratados con 5-FU/leucovorina (12,5 mg/kg) mediante infusión intravenosa los días 3, 5, 7, 21 y 22. En los mismos días los ratones fueron inyectados también por vía intraperitoneal con 0,2 mg de SC104 mab. Los ratones testigos recibieron SC104 solo o anticuerpo IgG de ratón testigo con 5FU/leucovorina. El tamaño del tumor se midió mediante calibradores y se calculó el área de sección transversal tumoral los días 12, 16, 19 y 23.

#### Resultados

Para determinar si estos efectos podían ser trasladados a la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*, se administró SC104 (200 µg/dosis) 3 veces a la semana a ratones trasplantados con extractos de 3 mm<sup>2</sup> de tumores C170 o tumores C170 que se habían dejado crecer durante 5 días antes de la administración del anticuerpo. Los animales fueron tratados con SC104 solo, 5-FU/leucovorina y la dosis máxima tolerada o una combinación de ambos durante 3 semanas. La figura 26a muestra que tanto SC104 como 5-FU/leucovorina solo dieron lugar a una inhibición de 50% del crecimiento tumoral de tumores recientemente explantados. Por el contrario, la combinación de ambos mostró una inhibición sinérgica del crecimiento. Los tumores en todos los grupos mostraron un aumento temporal del crecimiento tumoral hasta el día 16, en que comenzó la terminación escalonada. A partir del día 9, el grupo del tratamiento de combinación mostró una inhibición significativa del crecimiento en comparación con otros grupos de tratamiento como sigue:

SC104 y 5-FU, día 9; 37% de inhibición,  $p = 0,004$ ; día 12, 59% de inhibición,  $p = 0,002$ ; día 14, 74% de inhibición,  $p < 0,001$ ; día 16, 76% de inhibición,  $p < 0,001$ .

No hubo diferencia significativa entre el grupo tratado con SC104 y el que recibió en agente citotóxico, 5-FU/leucovorina. Esto se correlacionaba con una mejora significativa de la supervivencia de ratones tratados con SC104, 5-FU o la combinación (figura 26b). La combinación de grupo tratado con SC104 y 5-FU mostró una supervivencia mejorada en comparación tanto con el grupo testigo de vehículo y el grupo tratado con 5-FU como sigue:

Combinación:vehículo:  $p = 0,0038$ .

Combinación:citotóxico:agente  $p = 0,0111$  (todas las estadísticas mediante Log Rank)

Esta dosis de SC104 fue bien tolerada por todos los ratones que no mostraban pérdida de peso o alguna otra gran patología (figura 26c). Finalmente, cuando se administró SC104 terapéuticamente, 7 días después de la implantación tumoral de xenoinjerto C170, ni 5FU ni SC104 solos inhibieron significativamente el crecimiento, sin embargo, en combinación con 5FU/leucovorina, ambos inhibieron significativamente el crecimiento tumoral y mejoraron la supervivencia (figura 27). SC104 más 5-FU/leucovorina exhibió una reducción significativa en el peso final/tiempo e inhibieron el crecimiento tumoral con supervivencia mejorada en el modelo de xenoinjerto subcutáneo de C170.

**Listado de secuencias**

<110> Scancell Limited  
 Durrant, Lindy  
 Parsons, Tina  
 5 <120> Specific Binding Members  
 <130> P37068WO  
 <150> GB 0410627.4  
 <151> 2004-05-12  
 10 <160> 28  
 <170> PatentIn version 3.2  
 <210> 1  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Forward Primer (Heavy Chain)  
 <400> 1  
 atgagagtgc tgattctttt gtg  
 23  
 20 <210> 2  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Forward Primer (Kappa Chain)  
 <400> 2  
 atggatttwc argtgcagat twtcagcttc  
 30  
 <210> 3  
 <211> 35  
 30 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Reverse Primer (Heavy Chain)  
 <400> 3  
 cccaagcttc cagggrrccar kggataracg grtgg  
 35 35  
 <210> 4  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Reverse Primer (Kappa Chain)  
 <400> 4  
 cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga  
 30  
 <210> 5  
 45 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 5  
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp His  
 1 5 10  
 50 <210> 6  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <400> 6  
 ggctactcca tcacgagtgg ttatagttgg cac  
 55 33  
 <210> 7  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 60 <400> 7

ES 2 400 571 T3

```

Ser Gly Tyr Ser Trp His
1           5
<210> 8
<211> 18
<212> DNA
5 <213> Mus musculus
<400> 8
agtggttata gttggcac
18
<210> 9
<211> 16
10 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 9
His Ile His Phe Ser Gly Arg Pro Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Ser Ser
1           5           10           15
<210> 10
<211> 48
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 10
cacattcact tcagtggtag acctacttac aatccatctc tcagcagt
48
20 <210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 11
Lys Gly Lys Gly Ser Asp Asp Gly Leu Asn Tyr
25 1           5           10
<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Mus musculus
30 <400> 12
aagggaag gttccgacga tggtttgaac tac
33
<210> 13
<211> 10
<212> PRT
35 <213> Mus musculus
<400> 13
Ser Ala Ser Ser Ser Leu Ser Tyr Ile His
1           5           10
<210> 14
<211> 30
40 <212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 14
agtgccagct caagttaag ttacatacac
30
<210> 15
<211> 7
45 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 15
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1           5
50 <210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 16
gacacatcca acctggcttc t
55 21
<210> 17
<211> 9

```

```

<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 17
Phe Gln Gly Ser Glu Tyr Pro Leu Thr
 1             5
5 <210> 18
  <211> 27
  <212> DNA
  <213> Mus musculus
  <400> 18
  tttcagggga gtgagtatcc actcacc
10 27
  <210> 19
  <211> 39
  <212> DNA
  <213> Mus musculus
15 <400> 19
  ctcagtcacc gtctctagcg ctaaaacgac acccccacc
  39
  <210> 20
  <211> 39
  <212> DNA
20 <213> Mus musculus
  <400> 20
  ggtgggggtg tcgtttttagc gctagagacg gtgactgag
  39
  <210> 21
  <211> 39
  <212> DNA
25 <213> Mus musculus
  <400> 21
  ccaagctgga aatgacacgt acggatgctg caccaactg
  39
  <210> 22
  <211> 39
  <212> DNA
  <213> Mus musculus
30 <400> 22
  cagttggtgc agcatccgta cgtgtcattt ccagcttgg
  39
35 <210> 23
  <211> 154
  <212> PRT
  <213> Mus musculus
  <400> 23

```

ES 2 400 571 T3

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Cys Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro  
20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
35 40 45

Ser Gly Tyr Ser Trp His Trp Val Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Met  
50 55 60

Glu Trp Met Gly His Ile His Phe Ser Gly Arg Pro Thr Tyr Asn Pro  
65 70 75 80

Ser Leu Ser Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
85 90 95

Phe Leu Leu Gln Leu Lys Phe Val Thr Thr Glu Asp Thr Ser Thr Tyr  
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Lys Gly Lys Gly Ser Asp Asp Gly Leu Asn Tyr Trp  
115 120 125

Gly Gln Gly Ile Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
130 135 140

Pro Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Ser Leu  
145 150

<210> 24

<211> 463

5 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24

atgagagtgc tgattctttt gtcctgttc acagcctttc ctggatcct gtctgatgtg  
60

cagcttcagg agtcaggacc tgacctggtg aaaccttctc agtcactttc actcacctgc  
120

actgtcactg gctactccat cagcagtggt tatagttggc actgggtccg gcagtttcca  
180

ggaaacaaaa tggaatggat gggccacatt cacttcagtg gtagacctac ttacaatcca  
240

tctctcagca gtcgaatctc gatcactcga gacacatcca agaaccagtt cctcctgcaa  
300

ttgaaatttg tgactactga agacacatcc acatattttt gtgcaaggaa gggaaaaggt  
360

tccgacgatg gtttgaacta ctgggggtcaa ggaatctcag tcaccgtctc ttcagccaaa  
420

acgacacccc caccggttta tcccttggtc cctggaagct tgg  
463

<210> 25

10 <211> 154

ES 2 400 571 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Cys Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro  
 20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
 35 40 45

Ser Gly Tyr Ser Trp His Trp Val Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Met  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly His Ile His Phe Ser Gly Arg Pro Thr Tyr Asn Pro  
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 85 90 95

Phe Leu Leu Gln Leu Lys Phe Val Thr Thr Glu Asp Thr Ser Thr Tyr  
 100 105 110

Phe Cys Ala Arg Lys Gly Lys Gly Ser Asp Asp Gly Leu Asn Tyr Trp  
 115 120 125

Gly Gln Gly Ile Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro  
 130 135 140

Pro Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Ser Leu  
 145 150

5

<210> 26

<211> 463

<212> DNA

<213> Mus musculus

10

<400> 26

atgagagtgc tgattctttt gtgcctgttc acagcctttc ctggatcct gtctgatgtg  
 60

cagcttcagg agtcaggacc tgacctggtg aaaccttctc agtcactttc actcacctgc  
 120

actgtcactg gctactccat cacgagtggg tatagttggc actgggtccg gcagtttcca  
 180

ggaacaacaaa tggaatggat gggccacatt cacttcagtg gtagacctac ttacaatcca  
 240

tctctcagca gtcgaatctc gatcactcga gacacatcca agaaccagtt cctcctgcaa  
 300

ttgaaatttg tgactactga agacacatcc acatattttt gtgcaaggaa gggaaaaggt  
 360

tccgacgatg gtttgaacta ctgggggtcaa ggaatctcag tcaccgtctc ttcagccaaa  
 420

acgacacccc caccctgtta tcccttggtc cctggaagct tgg  
 463

<210> 27

<211> 147

<212> PRT

15



ES 2 400 571 T3

<213> Mus musculus

<400> 27

Met Asp Leu Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile  
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
35 40 45

Ser Ser Leu Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Arg Thr Ser  
50 55 60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
65 70 75 80

Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
100 105 110

Ser Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Thr  
115 120 125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Lys  
130 135 140

Leu Gly Lys

145

<210> 28

<211> 443

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 28

atggatttac aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc  
60

agaggagaaa atgttctcac ccagtctcca gtaatcatgt ctgcatctcc aggggaaaag  
120

gtccacatga cctgcagtgc cagctcaagt ttaagttaca tacactggta ccagcagaag  
180

tcaagaacct cccccaaact ctggatttat gacacatcca acctggcttc tggagtccca  
240

ggtcgcttca gtggcagtgg gtctggaaac tcttattctc tcacgatcag cagcatggag  
300

gctgaagatg ttgccactta ttactgtttt caggggagtg agtatccact cacgttcggg  
360

ggggggacca agctggaaat gacacgggct gatgctgcac caactgtatc catcttccca  
420

ccatccagta agcttgggaa ggg

443

5

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo, que comprende los siguientes dominios:

5 GYSITSGYSWH (aminoácidos 44 a 54 de la figura 1a) o SGYSWH (aminoácidos 49 a 54 de la figura 1a),

HIHFSGRPTYNPSLSS (aminoácidos 69 a 84 de la figura 1a),

10 KGKGSDDGLNY (aminoácidos 117 a 127 de la figura 1a),

SASSLSYIH (aminoácidos 46 a 55 de la figura 1c),

DTSNLAS (aminoácidos 71 a 77 de la figura 1c), y

15 FQGSEYPLT (aminoácidos 110 a 118 de la figura 1c),

en el que la unión del anticuerpo a una célula es capaz de inducir la muerte celular sin necesidad de células efectoras inmunes.

20 2. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos:

DVQLQESGPDLVKPSQSLSTCTVTGYSITSGYSWHWVRQFPGNKMEWMGHIHFSGRPTYNPSLSSRISITRDTSKN  
QFLLQLKVTTEDTSTYFCARKGKGSDDGLNYWGQGISVTVSSAKTTPPVYPLVPGSL (aminoácidos 19 a 138 de  
la figura 1a).

25 3. Un anticuerpo según la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende la secuencia de aminoácidos:

MRVLILLCLFTAAPGILSDVQLQESGPDLVKPSQSLSTCTVTGYSITSGYSWHWVRQFPGNKMEWMGHIHFSGRPT  
YNPSLSSRISITRDTSKNQFLLQLKVTTEDTSTYFCARKGKGSDDGLNYWGQGISVTVSSAKTTPPVYPLVPGSL  
30 (aminoácidos 1 a 138 de la figura 1a).

4. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia de aminoácidos:

35 ENVLTQSPVIMSASPGEKVTMTCSASSLSYTHWYQQKSRTSPKLWIYDTSNLAGSGVPGRFSGSGNSYSLTISS  
MEAEDVATYYCQGSEYPLTFGGGTKLEMTTRADAAPTVSIFPPSSKLGK (aminoácidos 23 a 128 de la figura 1c).

5. Un anticuerpo según la reivindicación 4, que comprende la secuencia de aminoácidos

40 MDSQVQIFSLISASVIMSRGENVLTQSPVIMSASPGEKVTMTCSASSLSYIHWYQQKSRTSPKLWIYDTSNLASGV  
PGRFSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYCFQGSEYPLTFGGGTKLEMTTRADAAPTVSIFPPSSKLGK (aminoácidos  
1 a 128 de la figura 1c).

6. Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente una región  
45 constante humana.

7. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores  
y un excipiente, diluyente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable.

8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, que comprende adicionalmente un agente activo  
50 seleccionado entre el grupo que consiste en doxorubicina, paclitaxel, 5-fluorouracilo, irinotecano y cisplatino.

9. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición farmacéutica según la  
reivindicación 7 o la reivindicación 8, para ser usado en medicina.

55 10. Un anticuerpo o composición farmacéutica según la reivindicación 9, para ser usado en el tratamiento de un  
tumor.

11. El uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición farmacéutica  
según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor.







Figura 1d Unión de SC104 quimérico a la superficie celular de células C170

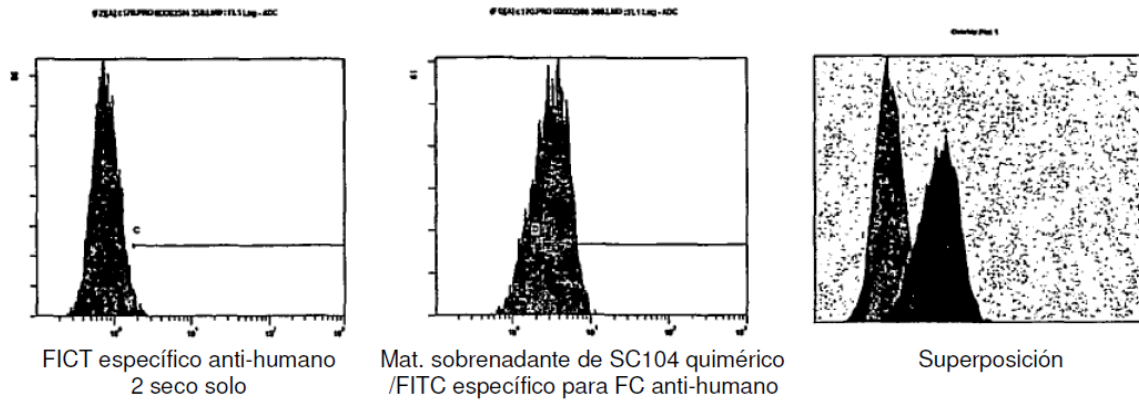


Figura 2a Unión de SC104 mab a líneas celulares tumorales

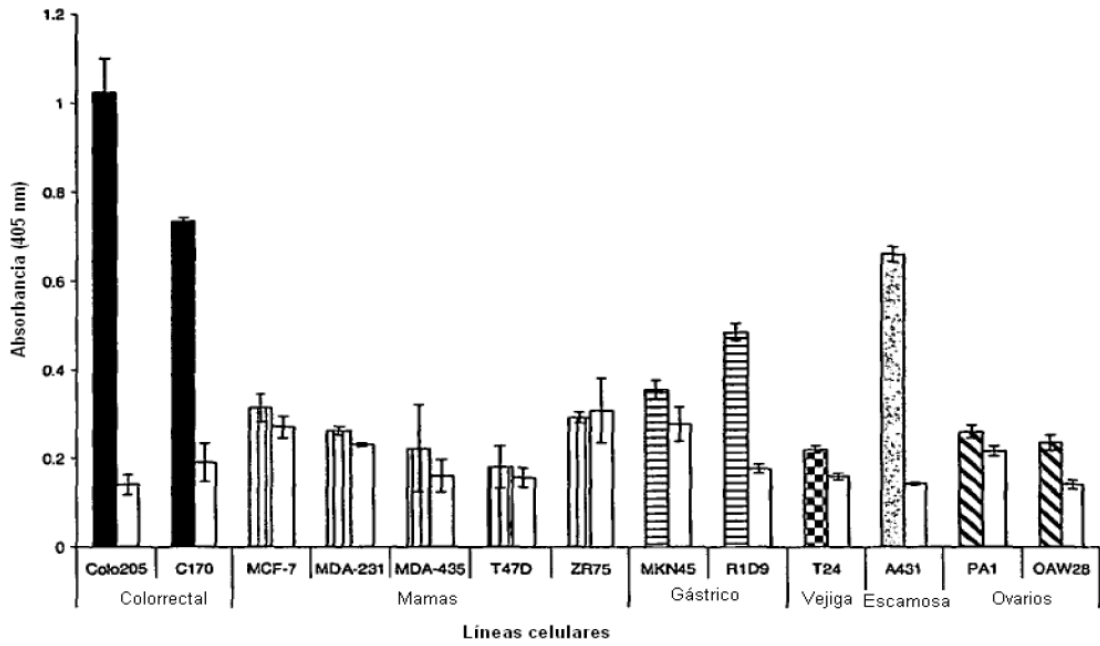


Figura 2b Unión de SC104 mab a diferentes líneas celulares tumorales

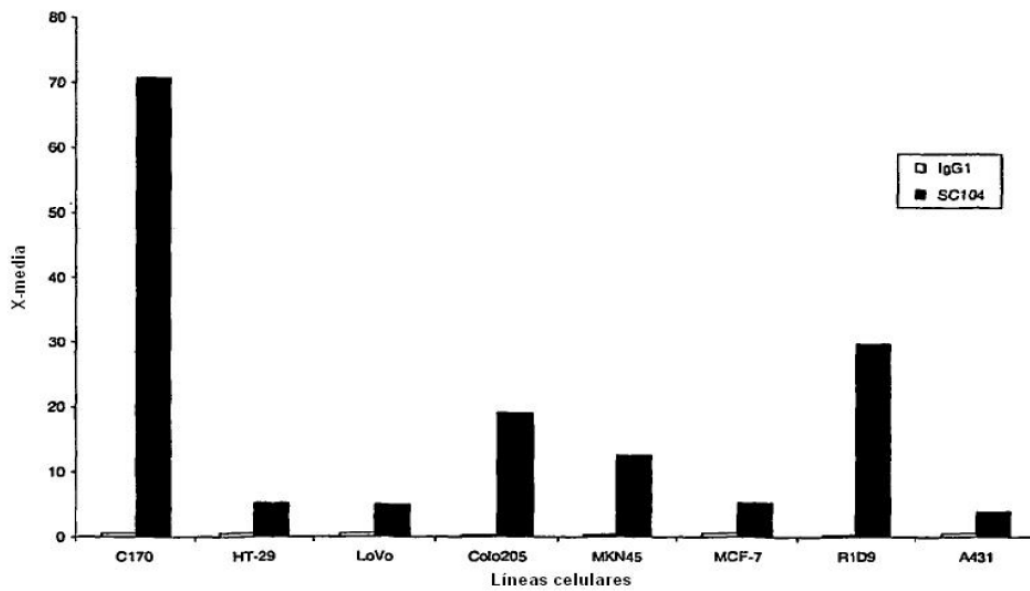


Figura 3

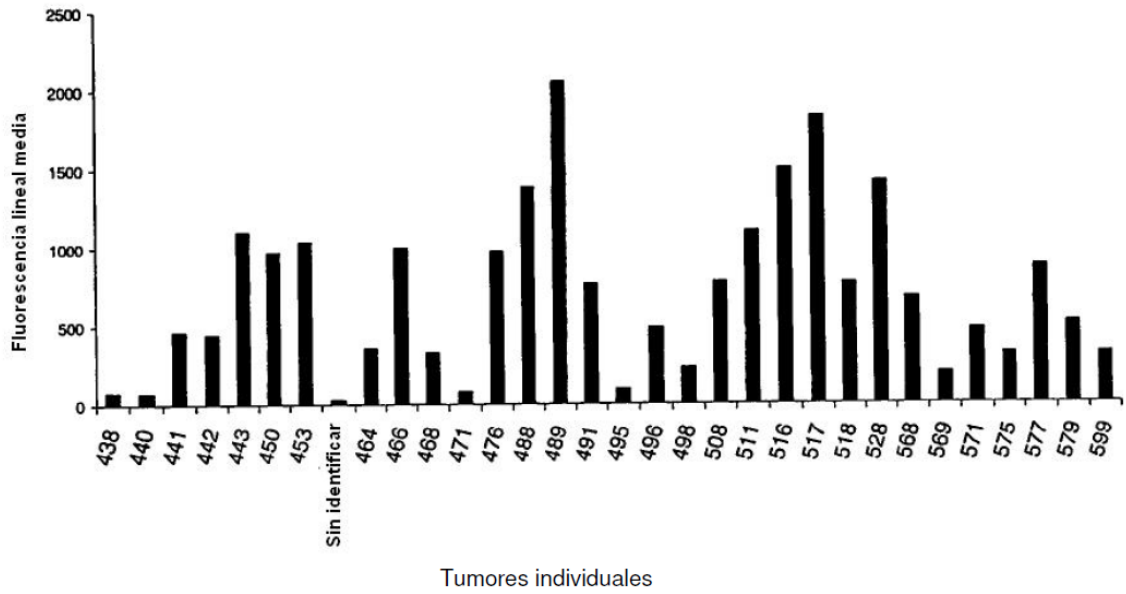


Figura 4 Unión de SC104 a extracto glicolípido, CEA y antígeno C14

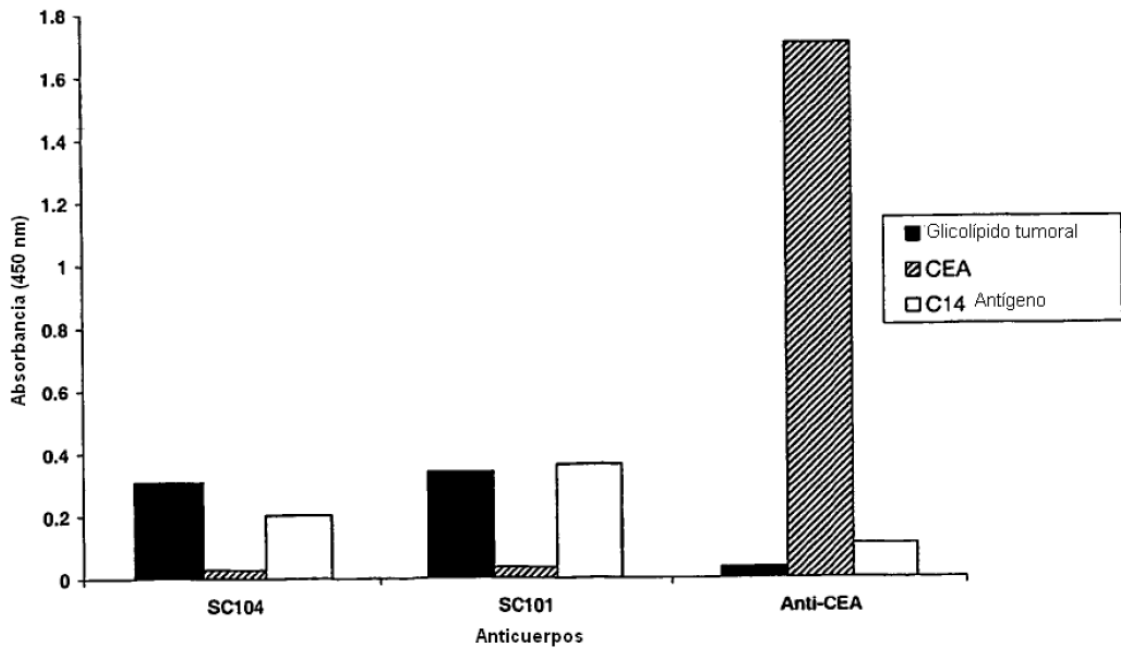
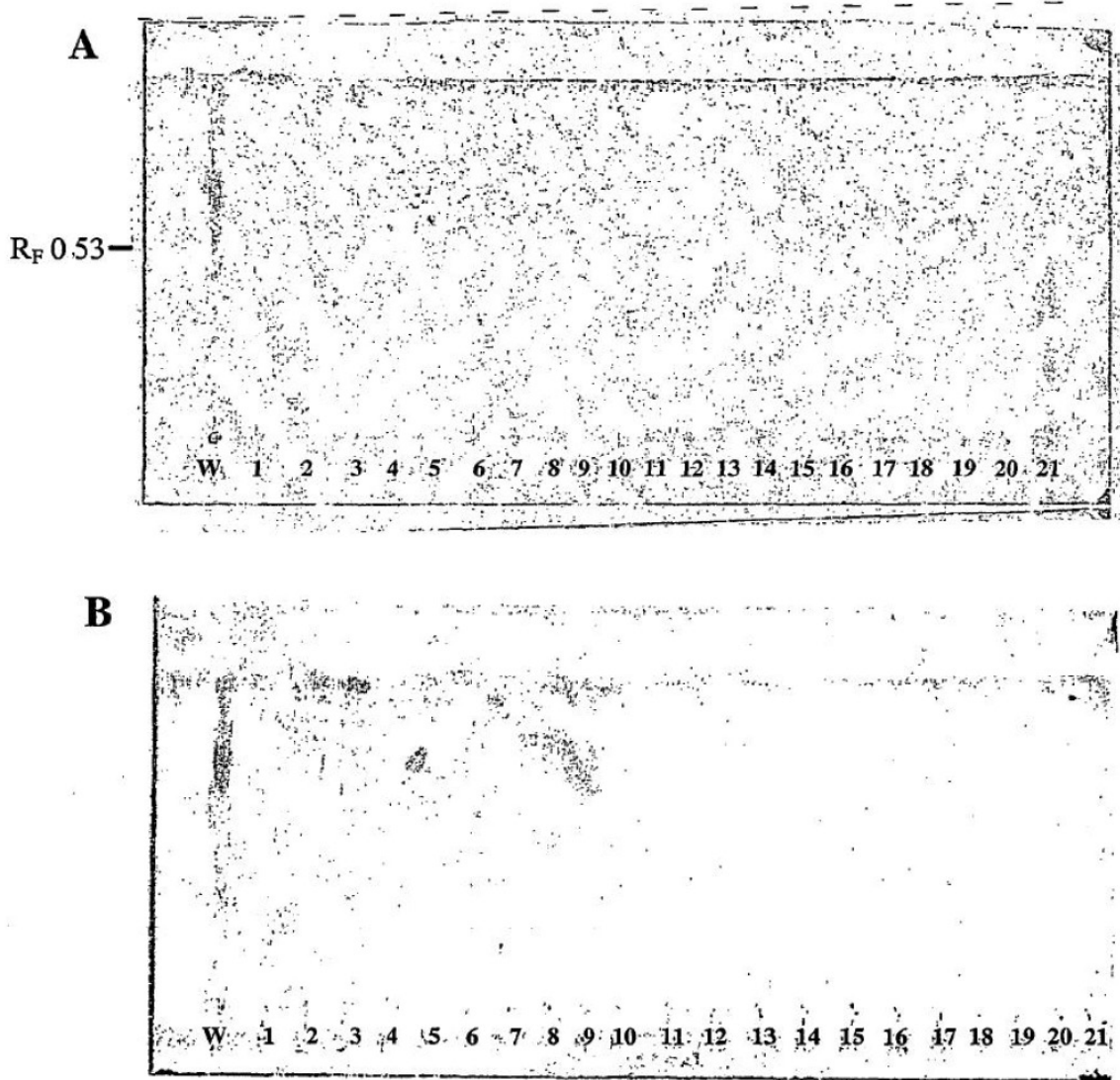
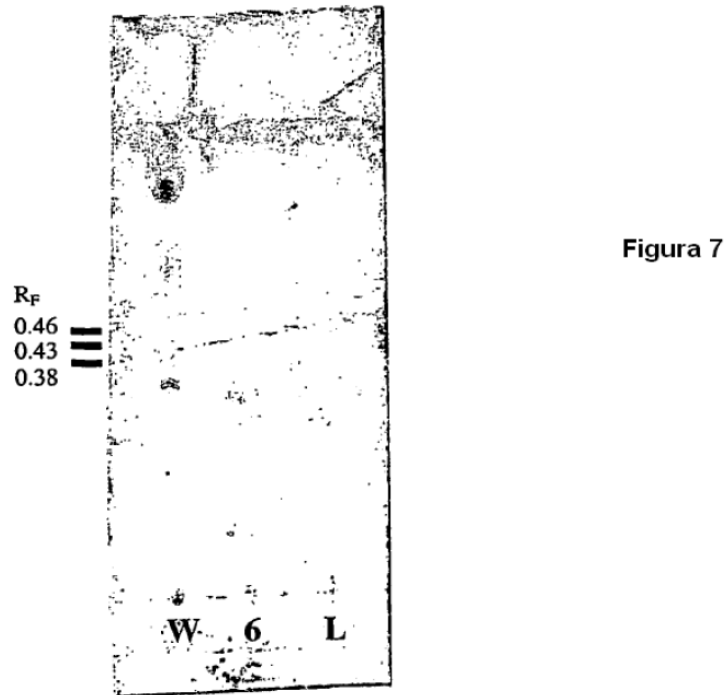
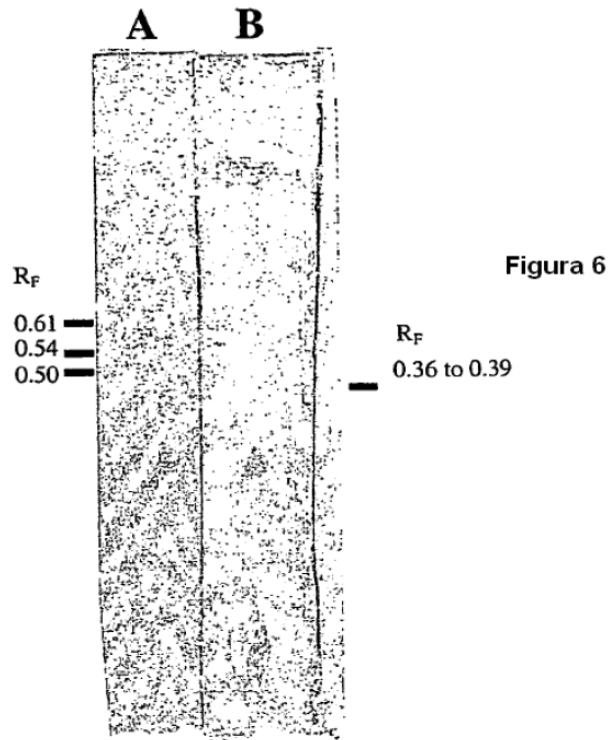




Figura 5





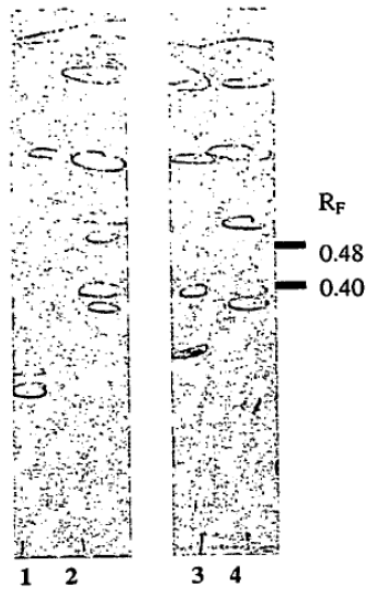


Figura 8

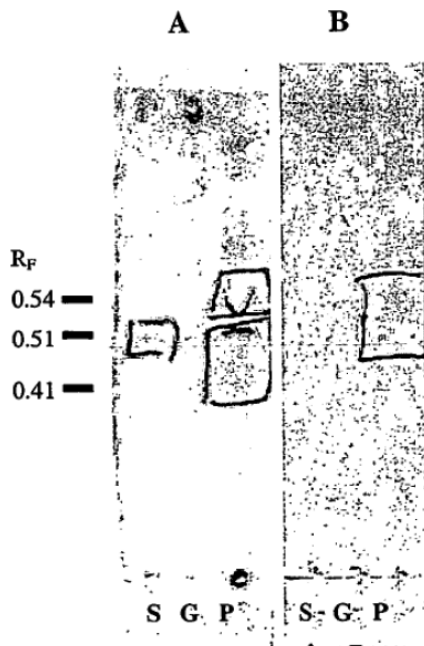


Figura 9

Figura 10

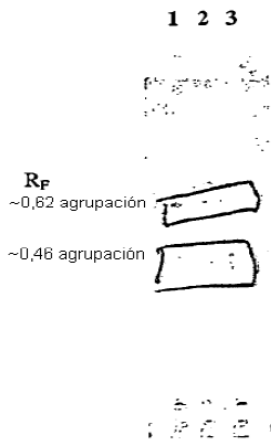
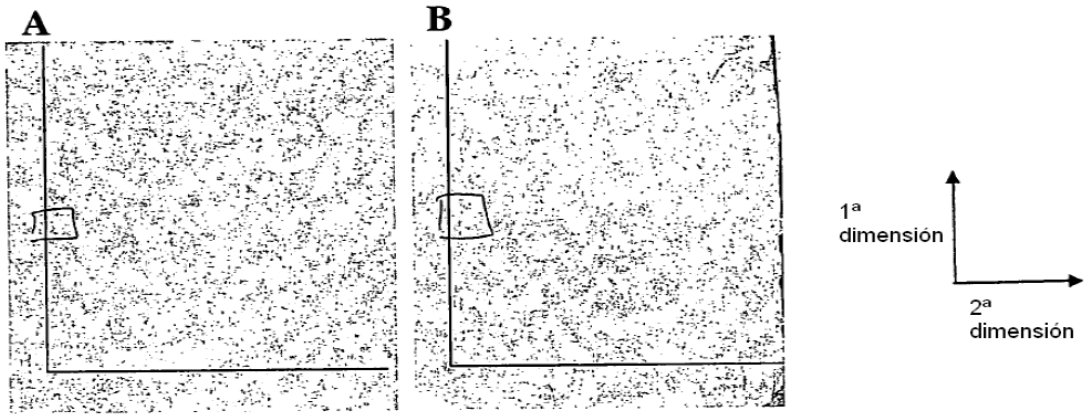


Figura 11

Figura 12

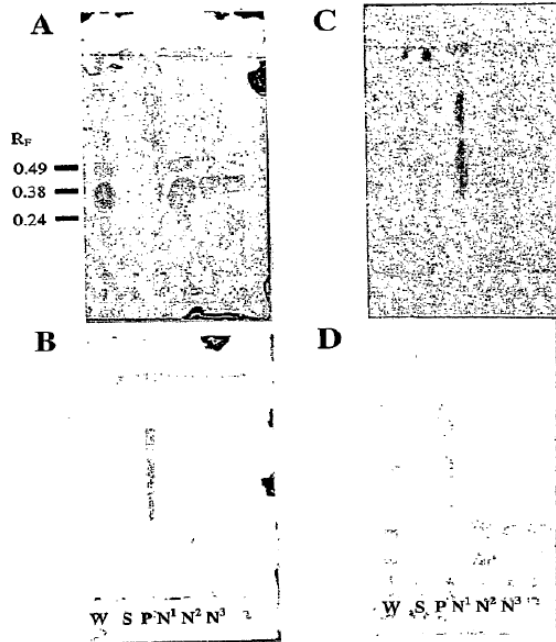
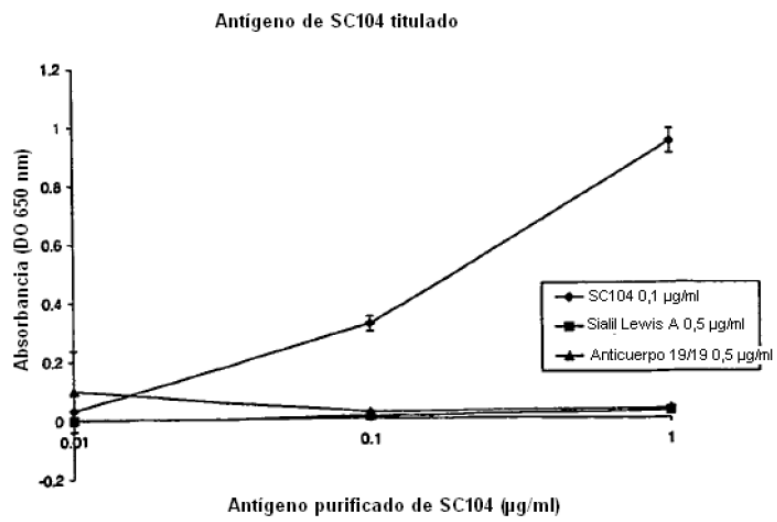
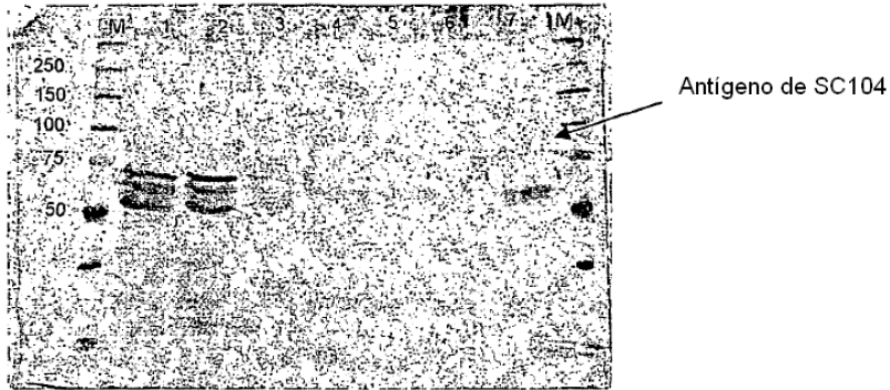


Figura 13



**Figura 14** - Gel teñido con plata que muestra antígeno inmuno-purificado de SC104 usando la columna de sefaroza de SC104-Proteína A



M = marcadores BioRad; 1 = esputo; 2 = desunido de columna; 3 = Tris 0,1 M pH 7,6 0,5% NP40; 4 = Tris 0,1 M pH 7,6 0,1% NP40 NaCl 1 M; 5 = Tris 0,1 M pH 7,6 0,1% NP40; 6 = Tris 0,1 M pH 7,6; 7 = Fracción reunida eluida con dietanolamina pH 11,5

**Figura 15** - La fracción de SC104 purificada de esputo que competía con SC104 biotina para la unión a células C170

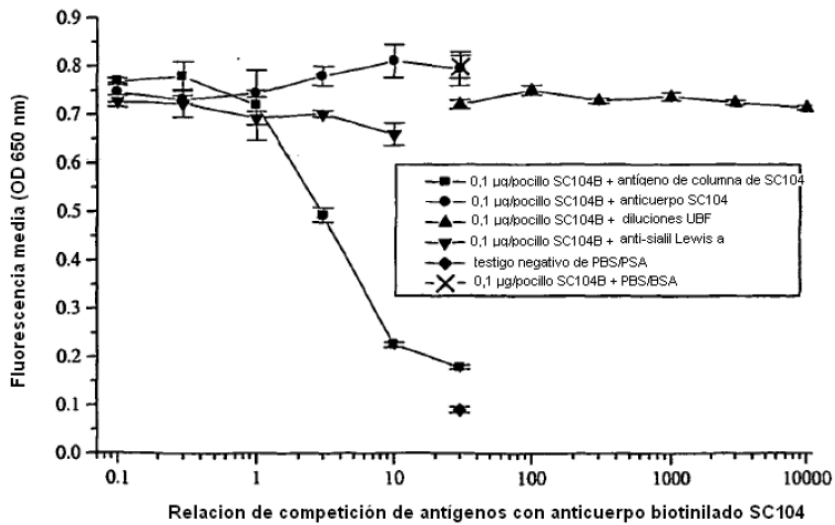


Figura 16

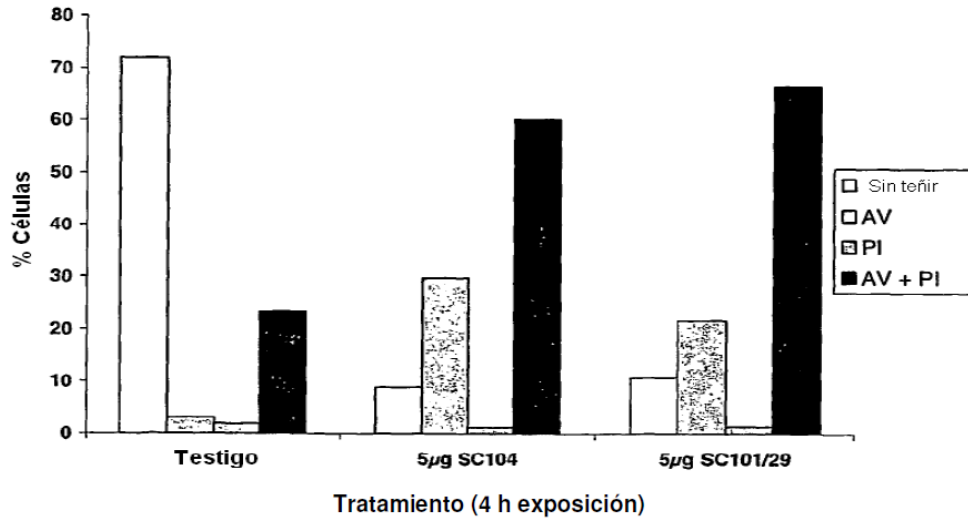


Figura 17 - Flujo de FITC-FMK-vad que muestra activación de pan caspasa en células de C170 adherentes

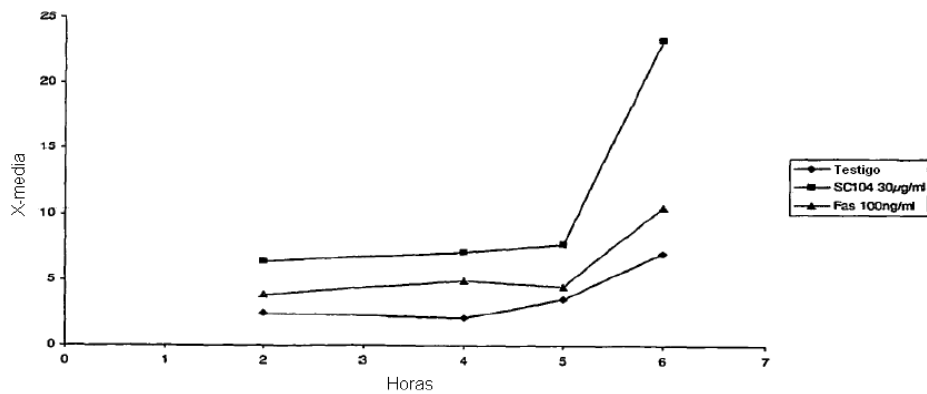


Figura 18 - Transferencia Wester con caspasa 6 de células C170 expuestas a SC104

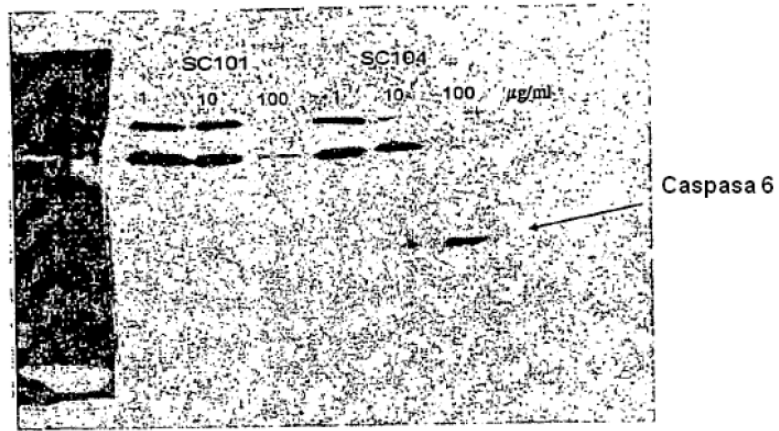


Figura 19 - Inhibición con SC104 de muerte celular: inhibidor de caspasa z-FMK-vad

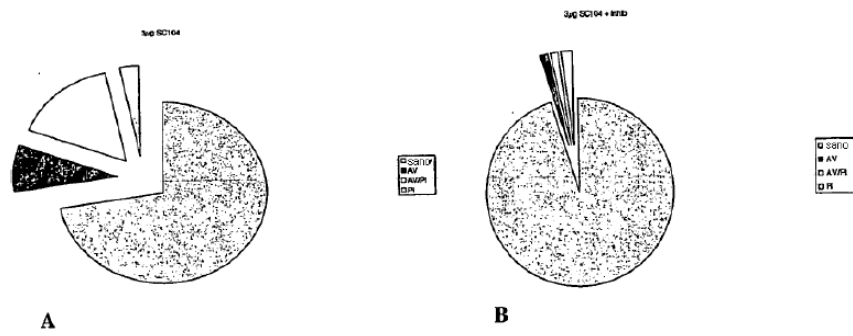




Figura 20 - Ensayos de inhibición celular

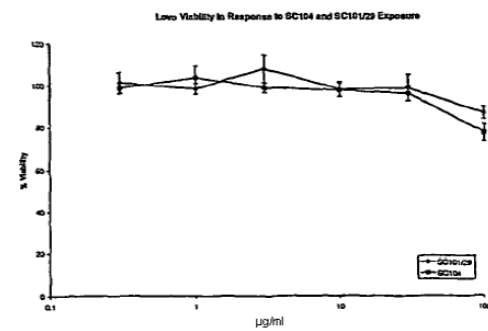
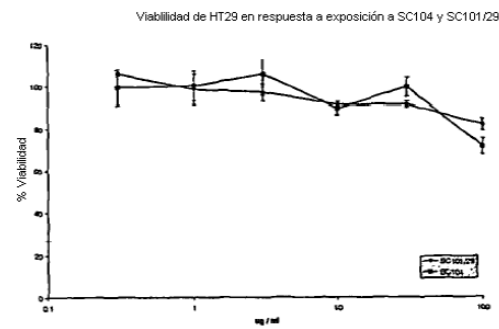
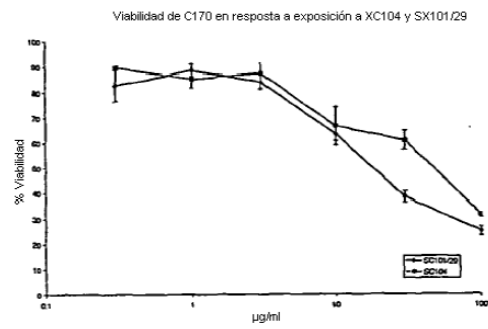
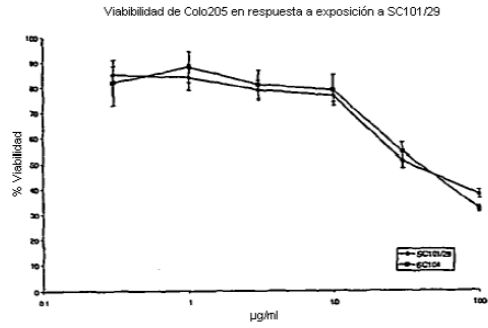


Figura 21 - IC<sup>50</sup> de SC104 para C170, Colo205, HT-29 y LoVo

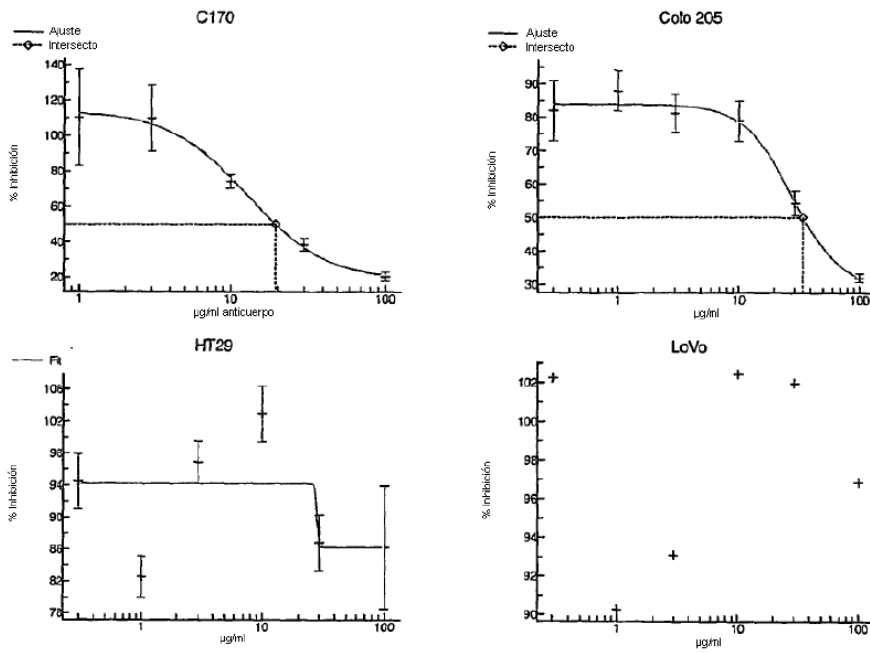


Figura 22

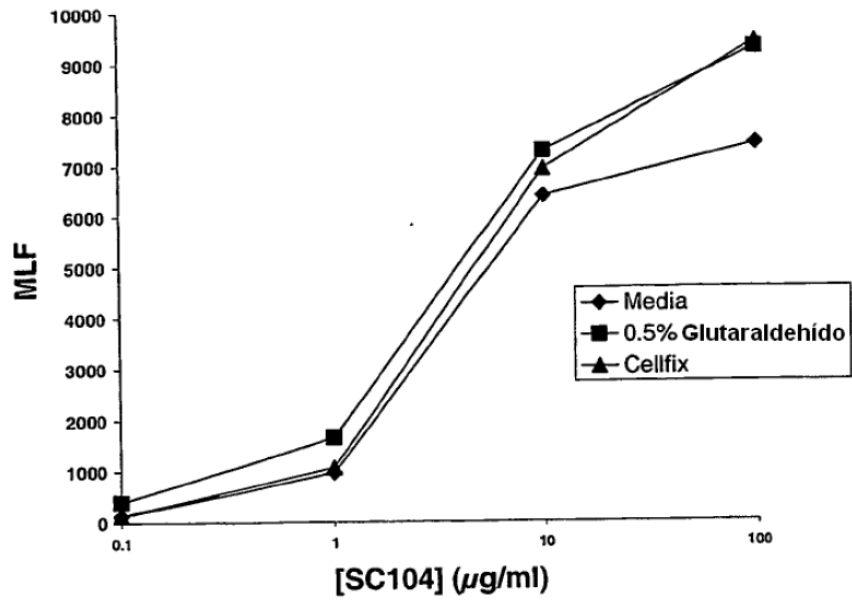


Figura 23a - Unión homofílica a SC104

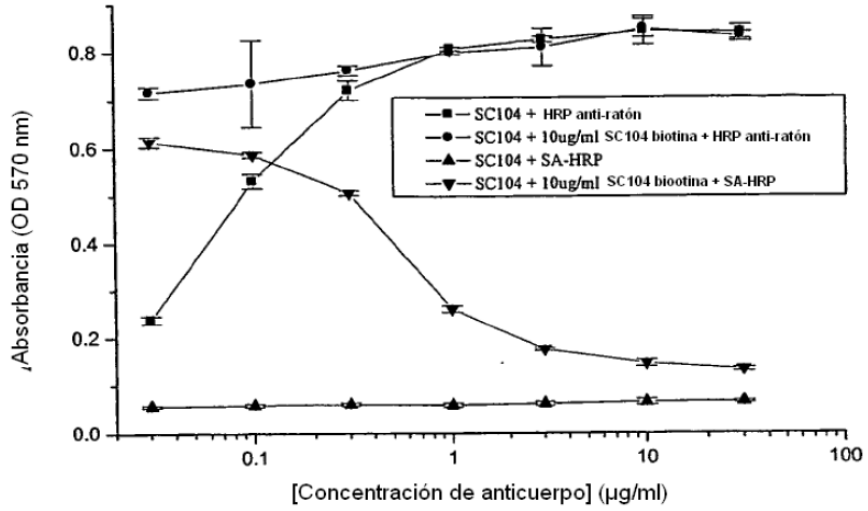


Figura 23b - Unión homofílica de SC104 en presencia de antígeno C14

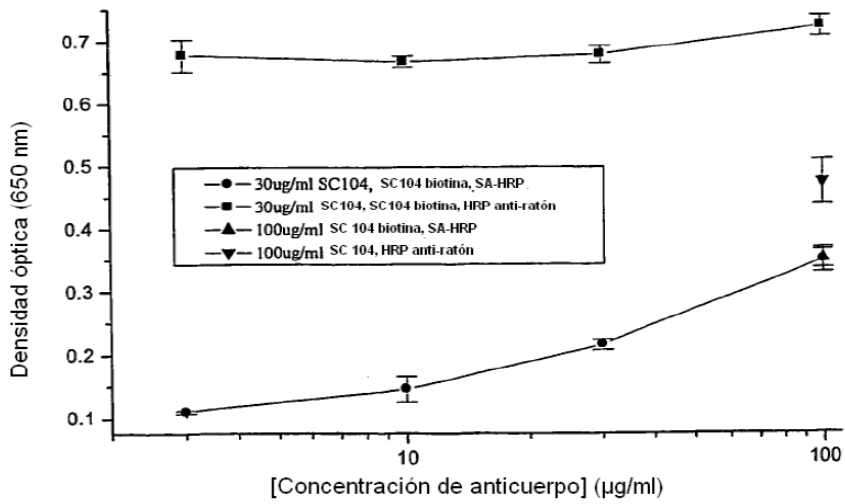


Figura 24

% Inhibición de proliferación de C170 en presencia de SC104 y 5-FU

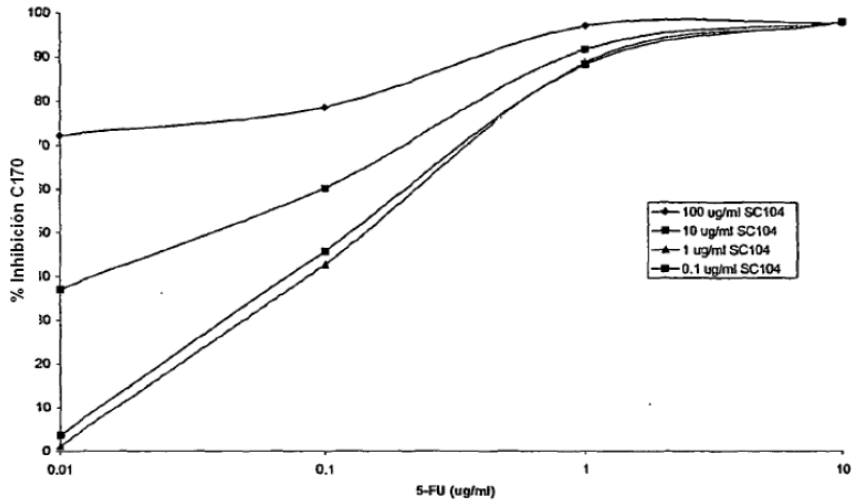


Figura 25 - Sinergia de SC104 con una gama de fármacos quimioterapéuticos

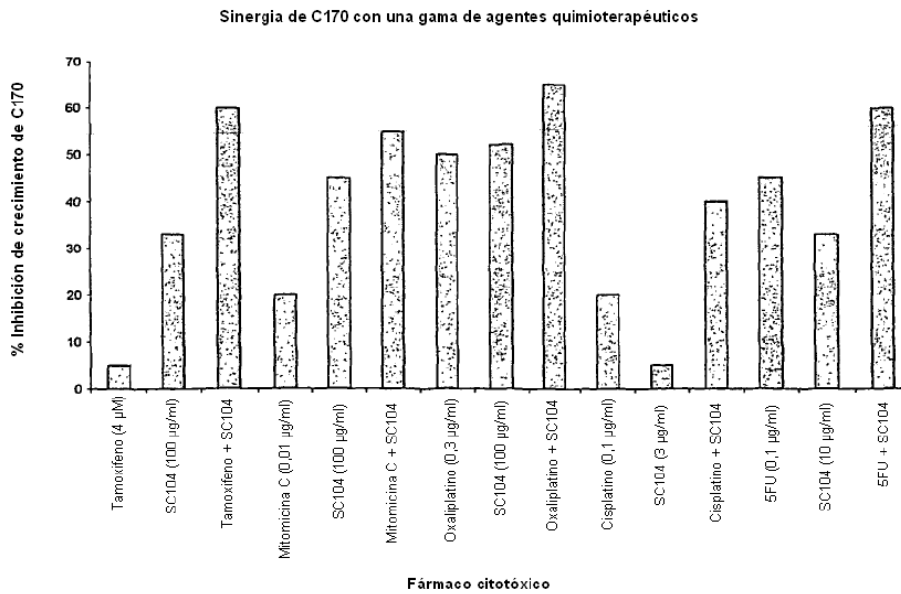


Figura 26a - Aumento en área de sección transversal tumoral

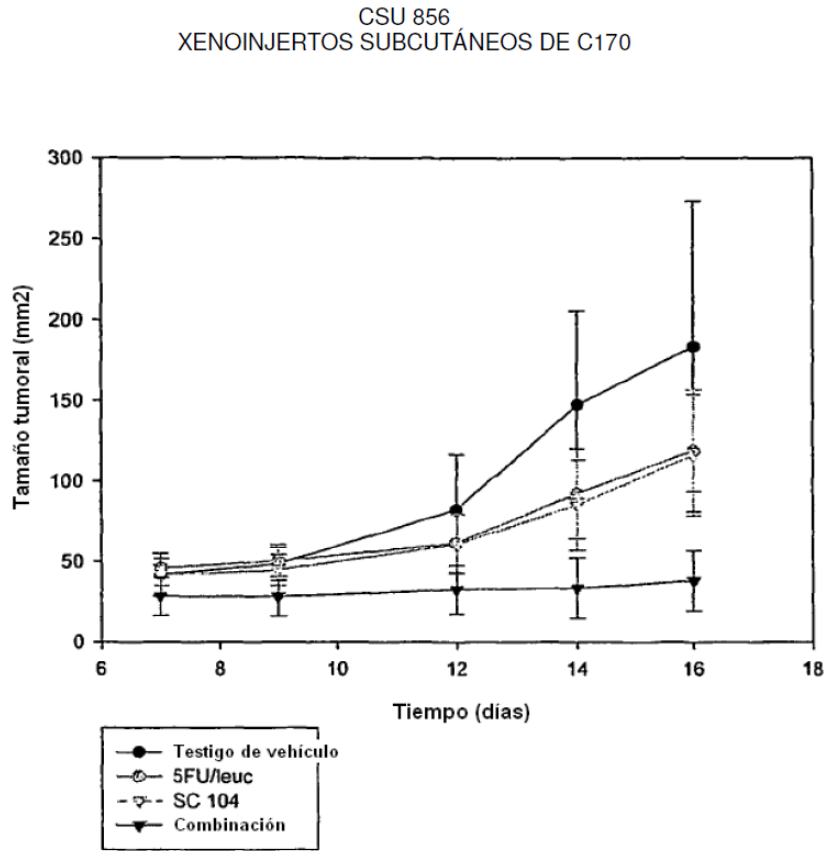


Figura 26b - Valoración de supervivencia

GRÁFICO DE SUPERVIVENCIA DE CSU 856

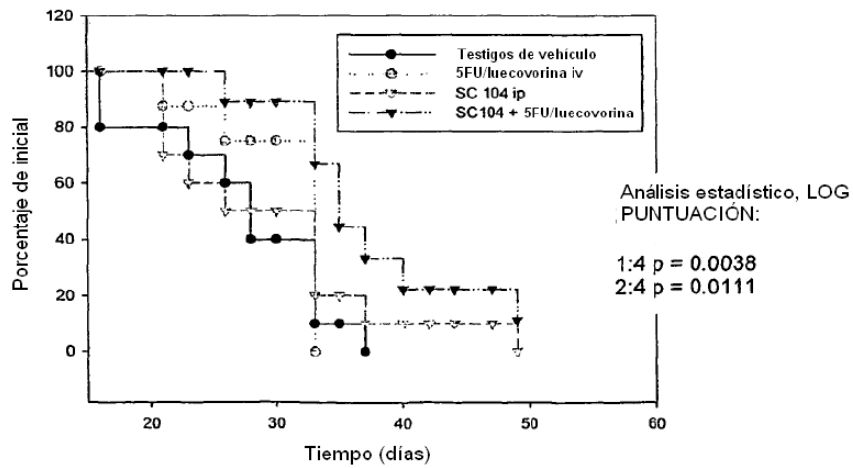


Figura 26c - Pesos de ratones

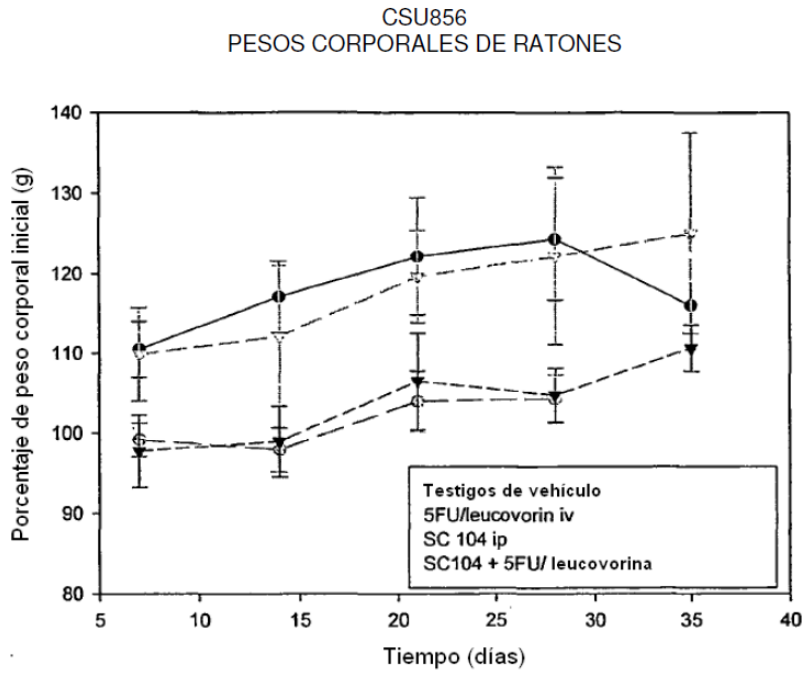
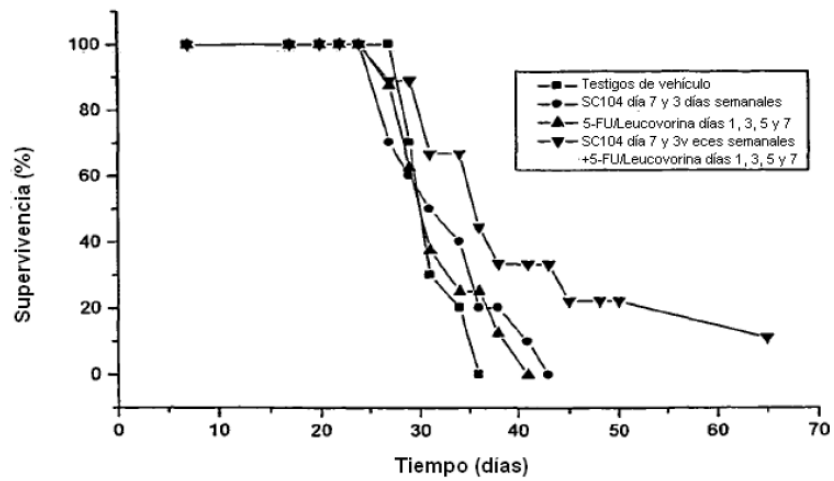


Figura 27 - Valoración de supervivencia terapéutica



Estos datos fueron obtenidos del estudio de SCU749a. SC104 más 5-FU/leucovorina exhibió una reducción significativa en el peso final/tiempo y crecimiento tumoral inhibido con supervivencia mejorada en el modelo de xenoinjerto subcutáneo de C170