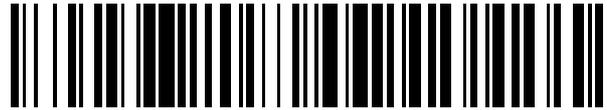


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 813**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2004** **E 04728755 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 1623997**

54 Título: **Anticuerpos recombinantes y fragmentos que reconocen el gangliósido N-glicolil-GM3 y su uso en el diagnóstico y tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

23.04.2003 CU 20030092

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

18.05.2015

73 Titular/es:

**CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR
(100.0%)
CALLE 216 Y 15, ATABEY, PLAYA
CIUDAD HABANA 12100, CU**

72 Inventor/es:

**ROQUE NAVARRO, LOUDES TATIANA;
MATEO DE ACOSTA DEL RÍO, CRISTINA MARÍA;
RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, MABEL;
ROJAS DORANTES, GERTRUDIS;
TALAVERA PÉREZ, ARIEL y
MORENO FRÍAS, ERNESTO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

ES 2 535 813 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos recombinantes y fragmentos que reconocen el gangliósido N-glicolil-GM3 y su uso en el diagnóstico y tratamiento de tumores**Campo técnico.**

La presente invención se refiere al campo de la inmunología y, en particular, a la obtención de inmunoglobulinas menos inmunogénicas utilizando la tecnología de ingeniería genética para su uso en el tratamiento del cáncer. La presente invención está relacionada específicamente con las secuencias de péptidos que codifican un anticuerpo monoclonal o fragmentos derivados que reconocen antígenos que contienen el gangliósido N-glicolil GM3 y no otros gangliósidos relacionados como N-glicolilo o N-acetilo, y ni glicolípidos sulfato.

Antecedentes de la invención.

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico y están presentes en las membranas plasmáticas de los vertebrados (Stults CLM et al., *Methods Enzymology* 179:167-214, 1989). Algunas de estas moléculas ha sido referidas en la literatura como antígenos asociados a tumores o marcadores tumorales (Hakamori SH: *Curr Opin Immunol* 3:646-653, 1991), a continuación se ha descrito el uso de anticuerpos anti-gangliósidos en el diagnóstico y la terapia del cáncer. (Houghton AN et. al, *NAS USA* 82:1242-1246, 1985; Zhang S et al. *Int J Cancer* 73:42-49, 1997). Los ácidos siálicos más comunes en células de los mamíferos son N-acetilo (NAc) y N-glicolilo (NGc) (Corfield AP et al., *Cell Biol Monogr* 10:5-50, 1982). Generalmente el NGc no se expresa en tejidos normales humanos y de pollo, pero se distribuye ampliamente en otros vertebrados (Leeden RW et al., *Biological Role of Sialic Acid*. Rosenberg A y Shengtrund CL (Eds). Plenum Press, Nueva York, 1-48, 1976, Kawai T et al., *Cancer Research* 51:1242-1246, 2001). Sin embargo los informes de la bibliografía demuestran que los anticuerpos anti-NGc reconocen algunos tumores humanos y líneas de células tumorales (Higashi H et. al, *Jpn J. Cancer Res.* 79: 952-956, 1988, Fukui Y et al., *Biochem Biophys Res Commun* 160:1149-1154, 1989). Se ha encontrado un incremento en el nivel de gangliósido GM3 (NGc) en cáncer de mama humano (Marquina G et al., *Cancer Research* 56:5165-5171, 1996), que hace muy atractivo el uso de esta molécula como diana para la terapia contra el cáncer. La patente presentada EP 0972782 A1 describe el anticuerpo monoclonal murino producido por el hibridoma depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest bajo el número de acceso ECACC 98101901. Este anticuerpo monoclonal tiene un isotipo IgG1 y fue generado mediante la inmunización de ratones Balb/c con el gangliósido NGcGM3 conjugado hidrófobamente con lipoproteínas de baja densidad (VLDL) y en presencia de coadyuvante de Freund, dicho anticuerpo se une preferentemente al gangliósido NGcGM3 y reconoce un antígeno expresado en tumores de mama y melanoma humanos. (Carr A et al., *Hybridoma* 19:3:241-247, 2000). Este anticuerpo mostró una fuerte actividad citotóxica sobre las células portadoras de dicha secuencia, una propiedad que podría convertirlo en una herramienta terapéutica.

Por otra parte se sabe que la neovascularización inducida por los tumores constituye uno de los principales parámetros en el control del crecimiento tumoral. Esto orienta la investigación hacia la búsqueda de nuevas armas terapéuticas relacionadas con la inhibición del proceso antigénico. Existen evidencias experimentales del efecto del anticuerpo 14F7 relacionado con este proceso. Dichas evidencias se han encontrado en el análisis del gel de la matriz (Angiogenesis. Vol. 4, págs. 113-121, 2001; *Anti-Cancer Res.* Vol.18, Págs. 783-790, 1998). El gel de la matriz es una mezcla de proteínas de la membrana basal y la matriz extracelular que rodea las células endoteliales. Su utilidad en el proceso de neovascularización radica en la importancia fisiológica de las interacciones endotelio-matriz durante el desarrollo de los nuevos vasos sanguíneos. Del mismo modo los componentes de este gel, tales como la laminina, se consideran marcadores importantes de este proceso.

Este tipo de modelo se ha utilizado también en el estudio de los mecanismos relacionados con la angiogénesis inducida por tumores que permite evaluar los fármacos capaces de modular los eventos directamente relacionados con el tumor influyendo así en su crecimiento y metástasis.

El uso de anticuerpos monoclonales no humanos, tales como 14F7 murino tiene ciertas desventajas para el tratamiento en seres humanos, concretamente en esquemas terapéuticos repetitivos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales murinos tienen una vida media en sangre relativamente corta. Adicionalmente pierden importantes propiedades inmunológicas, tales como las funciones efectoras cuando se utilizan en seres humanos.

Y lo que podría ser de mayor importancia, los anticuerpos monoclonales murinos contienen secuencias de aminoácidos considerables que son inmunogénicas cuando se inyectan en los seres humanos. Numerosos estudios han demostrado que después de la administración de un anticuerpo foráneo la respuesta inmunitaria producida en el paciente puede ser considerablemente fuerte y eliminar sustancialmente el efecto terapéutico del anticuerpo después de un tratamiento inicial. Por otra parte, incluso después de administrar el tratamiento a un paciente con un anticuerpo monoclonal murino, posteriores tratamientos con anticuerpos murinos no relacionados podrían ser ineficaces e incluso peligrosos debido a la reactividad cruzada conocida como respuesta HAMA (Khazaeli, M. B., et

al., *Journal of Immunotherapy* 15: 42-52, 1994).

Mateo et. al (Patente de los Estados Unidos Núm. US 5 712 120) describen un procedimiento para la reducción de la inmunogenicidad de los anticuerpos murinos. El anticuerpo modificado mediante el método descrito por Mateo et. al (Mateo C et al., *Hybridoma* 19: 6:463-471, 2000), conserva la capacidad reconocimiento y de unión al antígeno del anticuerpo original y resulta menos inmunogénico, lo que aumenta su utilidad terapéutica. Mediante este procedimiento se obtienen, con un pequeño número de mutaciones, anticuerpos modificados que muestran una reducción de la inmunogenicidad en comparación con el anticuerpo quimérico.

De lo anterior se infiere que de las versiones obtenidas de los anticuerpos terapéuticos que son menos inmunogénicos, las obtenidas de una manera simple y económica resultan adecuadas para la fabricación de formulaciones terapéuticas para su uso en seres humanos.

También se sabe que el uso de fragmentos de anticuerpos ha sido muy útil en el inmunodiagnóstico de enfermedades. Ira Pastan entre otros (Patente Europea presentada EP 0796334 A1) describe la construcción de fragmentos de cadena sencilla de tipo Fv utilizando las regiones variables de anticuerpos que reconocen específicamente los hidratos de carbono relacionados con el antígeno Y de Lewis. Basándose en dichos fragmentos el autor desarrolla un método para detectar células que portan dicho antígeno y también proporciona evidencias del efecto inhibitorio que estos fragmentos tienen sobre las células que portan el antígeno.

El conocimiento del sitio de unión del anticuerpo monoclonal 14F7 resulta interesante desde el punto de vista práctico y teórico debido al potencial de este antígeno en la inmunoterapia de diversas enfermedades. Souriau, C et al., en *Expert Opin. Biol. Ther.* 1, 845-855, 2001 y Chester, K. A., et al., en *Dis. Markers.* 16, 53-62, 2000, demuestran que el uso de fragmentos de anticuerpos del tipo scFv podría resultar de gran utilidad terapéutica aprovechando sus propiedades farmacológicas tales como una mejor penetración en el tejido tumoral.

La construcción de mini-bibliotecas de fragmentos de anticuerpos expuestos en fagos filamentosos a partir de hibridomas permite la selección de moléculas con la capacidad de reconocimiento específico del antígeno dentro de este repertorio. El objetivo es obtener rápidamente fragmentos de anticuerpos que combinan el reconocimiento del anticuerpo original con un tamaño molecular más pequeño y la capacidad de ser producidos por anfitriones bacterianos. Esta técnica permite destacar las múltiples variantes de fragmentos de anticuerpos que son no funcionales o cuya producción es imposible en bacterias, que se obtienen durante el aislamiento y la manipulación de los genes de las regiones variables de un hibridoma mediante técnicas de clonación convencionales (Roovers, R. C. et al., *Br. J. Cancer.* 78, 1407-1416, 1998).

La tecnología de presentación de fragmentos de anticuerpo en fagos filamentosos ofrece una oportunidad única para acceder al sitio de unión del anticuerpo, así como para introducir modificaciones en el anticuerpo con el objetivo de mejorar su afinidad (Chames, P. et al., *J. Immunol.* 161, 5421-5429, 1998, Lamminmaki, U et al., *J. Mol. Biol.* 291, 589-602, 1999, Parhami-Seren et al., *J. Immunol. Methods.* 259, 43-53, 2002) o para modular su especificidad (Iba, Y. et al., *Prot. Engn.*, 11, 361-370, 1998, Miyazaki, C. et al., *Prot. Engn.* 12, 407-415, 1999, Darveau, R. P. et al., *J. Clin. Immunoassay.* 15, 25-29, 1992).

La expresión de los fragmentos de anticuerpos en fagos filamentosos permite el intercambio de cadenas (Lantto, J. et al., *Methods Mol. Biol.* 178, 303-316, 2002), es decir la combinación de diferentes VL, con la VH del anticuerpo original o viceversa permitiendo así el estudio del papel que cada una de las cadenas juega en el reconocimiento del antígeno y su influencia en la afinidad del anticuerpo (Kabat, E. A., Wu, T. T., *J. Immunol.* 147, 1709-1719, 1991, Barbas III, C. F., Lerner, R. A. *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 2, 119-124, 1991). El intercambio de cadenas permite modificar las propiedades del sitio de unión y también combinar secuencias de inmunoglobulinas de diferentes especies y seleccionar aquellas variantes que conservan la especificidad de reconocimiento (Klimka, A. et al., *Br. J. Cancer.* 83, 252-260, 2000, Steinberger, P. et al., *J. Biol. Chem.* 275, 36073-36078, 2000, Rader, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 8910-8915, 1998, Beiboer, S. W. H. et al., *J. Mol. Biol.* 296, 833-849, 2000).

El documento EP0972782 A1 se refiere a la rama de la inmunología y la medicina humana, en particular a la generación y selección de un anticuerpo monoclonal que reconoce el oligosacárido ácido siálico N-glicoliladoglucosa- (N-GcNeu-Gal-Glu) presente en los tumores malignos.

La presente invención se refiere a un anticuerpo modificado derivado del anticuerpo monoclonal 14F7 murino que reconoce el antígeno original con la misma afinidad y resultados menos inmunogénicos cuando se administra a los pacientes. Otro hallazgo de la presente invención ha sido la obtención de fragmentos derivados de dicho anticuerpo que comprenden regiones variables de cadenas ligeras diferentes de la original, pero que conservan sus propiedades con respecto a la especificidad, afinidad y reconocimiento y pueden ser expresados por un anfitrión bacteriano en forma de moléculas solubles, así como presentados sobre la superficie de fagos filamentosos. Los fragmentos derivados del anticuerpo 14F7 son útiles como armas terapéuticas. Adicionalmente, la expresión de

fragmentos de tipo scFv del anticuerpo 14F7 sobre la superficie de un fago filamentoso M13 permite manipular el sitio de unión y obtener variantes con mayor afinidad con fines terapéuticos.

5 Uno de los objetivos de la presente invención es la caracterización de los fragmentos de anticuerpo que solo conservan parcialmente la secuencia de 14F7 pero conservan sus propiedades especificidad, afinidad y reconocimiento.

10 Tanto el anticuerpo modificado como los fragmentos obtenidos reconocen específicamente las células tumorales que expresan el antígeno NGcGM3 permitiendo de ese modo que sean utilizados en el diagnóstico o la terapia de dichos tumores y tienen la ventaja de resultar menos inmunogénicos que el anticuerpo murino del cual se originaron.

15 Nuevas composiciones terapéuticas que comprenden el anticuerpo 14F7 modificado o sus fragmentos Fv de cadena sencilla en donde dicho anticuerpo o fragmentos se pueden unir a un isótopo radioactivo útil en la localización o el tratamiento de tumores que expresan el antígeno son objetos de la presente invención.

Según se describe en la presente memoria, un método para el radioinmunodiagnóstico o radioinmunoterapia de tumores que expresan el gangliósido NGcGM3 utiliza las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo 14F7 modificado o sus fragmentos unidos a un isótopo radioactivo.

20 Descripción detallada de la invención.

En la presente invención se describe el anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo monoclonal 14F7 murino producido por el hibridoma con el número de depósito ECACC 98101901, caracterizado por las siguientes secuencias de las regiones hipervariables (CDR) de las cadenas pesada y ligera:

25 CADENA PESADA

CDR1: SYWIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

30 CADENA LIGERA

CDR1: RASQISNNLH

CDR2: YASQIS

CDR3: QQSNRWPLT

35 Preferentemente dicho anticuerpo quimérico se caracteriza por las siguientes secuencias de las regiones marco (FR) de las cadenas pesada y ligera:

CADENA PESADA

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT

40 FR2: WLKQRPDQGLEWIG

FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS

CADENA LIGERA

FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC

45 FR2: WYQQRTHESPRLLIK

FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLISVETEDFGMYFC

FR4: FGAGTKLELKRA

50 Por otra parte el anticuerpo quimérico se caracteriza por que contiene la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana y la región constante de la cadena ligera Ck humana.

Preferiblemente, dicho anticuerpo modificado se caracteriza por que contiene la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana y la región constante de la cadena ligera Ck humana.

55 Otro aspecto de la presente invención se refiere a los fragmentos de tipo Fv de cadena sencilla derivados del anticuerpo 14F7 que comprenden la secuencia de la región variable de la cadena pesada obtenida a partir del hibridoma (depósito ECACC 98101901) y que conserva la especificidad de reconocimiento de 14F7.

60 Preferiblemente, dichos fragmentos Fv incluyen regiones variables de cadena ligera derivadas de ratones o seres humanos no inmunizados, diferentes de la región variable de cadena ligera producida por el hibridoma referido que permiten su producción por un anfitrión bacteriano como fragmentos de anticuerpos presentados sobre fagos filamentosos o moléculas solubles.

La presente invención también está relacionada con las líneas celulares que expresan los anticuerpos quiméricos y

humanizados y los clones bacterianos que producen los fragmentos derivados de 14F7.

Además, la presente invención está relacionada con las composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o la localización y la identificación de tumores de mama y melanoma malignos, sus metástasis y recidivas caracterizados por contener uno de los anticuerpos monoclonales recombinantes o sus fragmentos de la presente invención, así como un excipiente adecuado para su aplicación. Dicho anticuerpo o fragmento podrían estar unidos a un isótopo radioactivo útil en la localización y/o la terapia de los tumores malignos. Finalmente, la presente invención está relacionada con el uso de los anticuerpos recombinantes descritos para su uso en la fabricación de una composición farmacéutica útil en el tratamiento y/o la localización y la identificación de tumores malignos.

La descripción detallada de cómo ejecutar y utilizar la presente invención es referida a continuación:

1. Síntesis de ADNc y amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de las regiones variables del anticuerpo murino 14F7.

El anticuerpo 14F7 murino se obtuvo mediante la inmunización de ratones Balb/c con el gangliósido GM3 (NeuGc) conjugado de manera hidrófoba con lipoproteínas de baja densidad y en presencia de coadyuvante de Freund (Documento EP 0972782 A1, Carr A et al., *Hybridoma* 19:3:241-247, 2000). El ARN se obtiene a partir de 10^6 células del hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 14F7 (Mab IgG1 murino) que reconoce el gangliósido NGcGM3 utilizando el método de extracción de TRIZOL (GIBCO BRL, NY), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La síntesis del ADN complementario (ADNc) y la amplificación de las regiones variables VH y VL se realizaron utilizando el conjunto de reactivos: Access RT-PCR (Promega, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, la reacción se lleva a cabo a partir de 5 µg de ARN en presencia de 25 pmoles del oligonucleótido dT diseñado para hibridar en la cola poli A del ARN y los correspondientes oligonucleótidos de los extremos de cada región variable: VH y VL. Se incubó durante 10 minutos a 60°C y después se añade la mezcla que contiene 0,2 mM de cada desoxinucleótido (dNTP), MgSO₄ 1 mM, 5 µ de Transcriptasa Inversa AMV y 5 µ de la ADN polimerasa en tampón de reacción para un volumen total de 50 µl. Las muestras se incuban durante 45 minutos a 48°C, 2 minutos a 94°C y a continuación se someten a 40 ciclos de PCR con temperaturas de 94°C (30 segundos), 60°C (1 minuto), 68°C (2 minutos), y una incubación final de 7 minutos a 68°C.

2. Construcción de genes quiméricos y secuenciación del ADNc amplificado.

Los productos de la PCR de VH y VK se digieren con las enzimas de restricción *Eco* RV-*Nhe* I, para VH, y *Eco* RV-*Sal* I para VK, y se clonan en los vectores de expresión respectivos (Coloma M. J. et al., *J. Immunol. Methods* 152:89-104, 1992). La región VH se clona en el vector PAH4604 que ha incluido una región constante humana de IgG1 y como marcador de selección, el gen resistente a L-histidinol. La región VK se clona en el vector PAG4622, que porta un gen de resistencia al ácido micofenólico y una región constante kappa humana. Las construcciones genéticas resultantes se denominaron 14F7VH-PAH4604 y 14F7VK-PAG4622, respectivamente.

Ambas construcciones se secuencian por medio del método de didesoxinucleótido (Sanger F et al., *PNAS USA* 74:5463-5470, 1979) utilizando el kit de reactivos de secuencia de ADN polimerasa T7 (Amersham-Pharmacia) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante.

3. Expresión del anticuerpo quimérico.

Las células NSO se someten a electroporación con 10 µg de 14F7VH-PAH4604 y 10 µg de 14F7VK-PAG4622 linealizados con la enzima *Pvu* I. Los ADN se precipitan con etanol, se mezclan y se disuelven en 50 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato). Se hacen crecer aproximadamente 10^7 células hasta la semiconfluencia y se recogen por centrifugación. Las células se resuspenden a continuación en 0,5 ml de PBS junto con el DNA en una bandeja de electroporación. Después de 10 minutos en hielo, las células se someten a un pulso de 200 V y 960 F, y se mantienen en hielo durante 10 minutos. Las células se cultivan en placas de 96 pocillos en medios de cultivo selectivos Modificado de Dulbecco (DMEM-F12), con suero de ternera fetal al 10% (FCS) y 10 mM de L-histidinol. Los clones transfectados se hacen visibles pasados 10 días de la adición de los medios de selección.

La producción de inmunoglobulina quimérica se determina mediante ELISA del sobrenadante de los clones. Para esto, las placas de poliestireno (de alta unión, Costar) se recubrieron con suero anti IgG de humana de cabra en tampón carbonato-bicarbonato 100 mM, pH 9,8, toda la noche a 4°C. Las placas se lavan a continuación con PBS-Tween (solución salina tamponada con fosfato, Tween-20 al 0,5%, pH 7,5), y se añaden y se incuban durante una hora a 37°C las muestras de sobrenadante de cultivo diluidas en PBS-Tween-FCS. Las placas se lavan de nuevo en PBS-Tween y a continuación se incuban en suero anti-cadena kappa humana de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson), durante una hora a 37°C. Más tarde las placas se lavan de la misma manera y se incuban con una solución tampón de citrato-fosfato de pH 4,2 que contiene el sustrato: o-fenilendiamina. Después de 15 minutos, se mide la absorción a 492 nm.

5 La capacidad del anticuerpo quimérico que reconoce el antígeno es verificada mediante un ELISA competitivo utilizando los gangliósidos NGcGM3 y NacGM3. En resumen, las placas de poliestireno (Polysorp, Nunc) se recubren con 50 µl de una disolución a 4 µg/ml de NGcGM3 o NAcGM3 en metanol y se incuban durante una hora a 37°C. Las placas se bloquean a continuación con 200 µl de disolución de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en tampón Tris-HCl, pH 7,8-8,0 durante una hora a 37°C. Después de 3 lavados con PBS, se añaden las muestras diluidas en Tris-HCl-BSA al 1% a un intervalo de concentración entre 2 µg/ml - 0,01 µg/ml en presencia del anticuerpo 14F7 murino biotinilado 1 mg/ml, a 37°C durante 2h. Después las placas se lavan con PBS y la reacción se revela con un producto conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Jackson), a 37°C, 1 h. La absorbancia se mide a 10 492 nm.

4. Construcción del Ab 14F7hT humanizado mediante humanización de epítomos T. Predicción de epítomos T.

15 Las secuencias de los dominios variables de 14F7 se analizan con el programa AMPHI (Margalit H et al., J Immunol 138: 2213-2229, 1987), que permite la identificación de los segmentos de 7 o 11 aminoácidos con una estructura de hélice anfipática, que se ha relacionado con la inmunogenicidad de las células T. Estos algoritmos predicen en este caso los fragmentos relacionados con la presentación de epítomos T en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal 14F7 murino.

20 - Análisis de homología con inmunoglobulinas humanas.

25 Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de 14F7 se comparan con las secuencias de regiones variables de inmunoglobulinas humanas referidas para identificar la inmunoglobulina humana que tiene la mayor homología con la molécula murina que se está analizando. Para ello se puede utilizar la base de datos disponible en Internet SWISSPROT, a través del programa BLAST (Altschul S F et al., Nucleic Acids Res 25:3389-3402, 1997).

- Análisis para la reducción de la inmunogenicidad.

30 La esencia del método reside en la consecución de la reducción de la inmunogenicidad mediante la ruptura o la humanización de los posibles epítomos T, con un mínimo de mutaciones en las FR, específicamente en aquellos segmentos que tienen una estructura de hélice anfipática con excepción de las posiciones implicadas en la estructura tridimensional del sitio de reconocimiento del antígeno. De acuerdo con el método, las secuencias de las regiones variables VH y VL de la inmunoglobulina murina se comparan con la humana de homología más alta y se identifican los residuos que difieren entre la secuencia murina y la humana solo en las regiones anfipáticas que están dentro de la región de las FR (Kabat E, Sequences of proteins of immunological interest, quinta edición, National Institute of Health, 1991). Estos residuos "murinos" serán los susceptibles de ser silenciado por aquellos que se encuentran en la misma posición de la secuencia humana.

40 Los residuos presentes en las posiciones de FR responsables de la estructura canónica, los presentes en la zona de Vernier o los que participan en la interacción de la interfase VH-VL no pueden ser mutados, ya que esto podría afectar a la estructura tridimensional del dominio variable del anticuerpo y por lo tanto afectar a la unión al antígeno. Se puede obtener Información adicional acerca de la influencia de las sustituciones propuestas sobre la estructura terciaria mediante modelado molecular de las regiones variables.

45 Dado que en el análisis de los elementos mutaciones tales como la presencia de residuos de prolina en la hélice anfipática o el hecho de que un determinado residuo murino no aparece en la misma posición en la secuencia humana más homóloga, pero son frecuentes en otras inmunoglobulinas humanas, se puede considerar que es posible obtener una versión que contiene un máximo de mutaciones, es decir, donde todos los residuos murinos que difieren de la secuencia humana son mutados, pero se pueden obtener otras versiones con diferentes combinaciones de mutaciones.

50 Después de identificar en la secuencia murina de 14F7 los posibles epítomos T e identificar de dentro de estos segmentos los residuos distintos de los humanos, se realizan sustituciones mediante técnicas convencionales de mutagénesis dirigida.

55 - Clonación y expresión del anticuerpo humanizado 14F7hT en células NSO.

60 Una vez que las construcciones genéticas correspondientes a las regiones VH y VL del anticuerpo 14F7hT se obtienen por medio del método descrito anteriormente, se clonan en los respectivos vectores de expresión de manera similar a la descrita anteriormente en el caso de la construcción de anticuerpo quimérico, obteniendo las siguientes construcciones genéticas: 14F7hTVK-PAG4622 y 14F7hTVH-PAH4604. Las transfecciones de estos genes a células NSO están exactamente bajo las mismas condiciones descritas para el anticuerpo quimérico. Los clones que producen el anticuerpo humanizado también son detectados por medio de ELISA.

La capacidad de reconocimiento específico del antígeno por el anticuerpo humanizado es verificada mediante un ELISA competitivo utilizando los gangliósidos NGcGM3 y NAcGM3. El procedimiento es idéntico al descrito para el anticuerpo quimérico

5 5. Construcción de bibliotecas de fragmentos de anticuerpos en fagos filamentosos a partir del hibridoma 14F7.

El ARN mensajero se aísla de las células del hibridoma 14F7, se sintetiza el ADN complementario y las secuencias correspondientes a las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se amplifican por separado utilizando dos conjuntos de oligonucleótidos diseñados para hibridar con un amplio espectro de regiones variables murinas. Las regiones variables de cada cadena pesada amplificada se purifican, se digieren con las enzimas apropiadas y se unen al vector fagémido PhG-1m (diseñado para la presentación de anticuerpos de cadena sencilla en la superficie de fagos filamentosos), previamente digerido con la misma enzima. Los productos de la reacción de unión se purifican y se introducen por medio de electroporación en bacterias de la cepa TG1 de *E. Coli*. Las bacterias transformadas constituyen un semi-biblioteca de regiones variables de cadena pesada de diversidad limitada (todas ellas derivadas del hibridoma 14F7). El ADN correspondiente a esta semi-biblioteca se purifica y se une por separado a colecciones de regiones variables de la cadena ligera (previamente purificadas y digeridas con las enzimas apropiadas). Finalmente las construcciones genéticas se introducen en bacterias de la cepa TG1 mediante electroporación, para conformar diferentes tipos de bibliotecas independientes. Una de ellas es una mini-biblioteca de diversidad limitada construida con las regiones variables de la cadena ligera, también obtenidas a partir de las células del hibridoma 14F7. También se obtienen bibliotecas de intercambio de cadena en las que las regiones variables de las cadenas pesadas del hibridoma se combinan con diversas colecciones de regiones variables de cadenas ligeras obtenidas a partir de linfocitos murinos y humanos.

25 6. Aislamiento y caracterización de los clones que producen fragmentos de anticuerpos contra el N-glicolil GM3.

Se toman al azar colonias de cada biblioteca para producir fagos a partir de ellas utilizando el fago coadyuvante M13 K07. El reconocimiento de N-glicolil GM3 para los fagos que portan los fragmentos de anticuerpo se analiza directamente mediante un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA). De este modo, se localizan los clones que producen los fragmentos funcionales. Los fagos que portan fragmentos de anticuerpos de la mezcla total de bacterias transformadas que forman cada biblioteca se producen para obtener una preparación rica en fragmentos de anticuerpos funcionales y explorar la diversidad de las bibliotecas. La mezcla de fagos obtenida se pone en contacto con el antígeno N-glicolil GM3 unido a una superficie sólida, los fagos que portan los fragmentos de anticuerpo con capacidad de unión son retenidos y el resto se elimina mediante lavados exhaustivos. Los fagos unidos se eluyen mediante un cambio de pH y se multiplican para obtener una nueva mezcla de fagos que sirve como material de partida para un nuevo ciclo de selección sobre el antígeno. Después de varios ciclos de selección se analiza el reconocimiento de los fragmentos de anticuerpos presentados sobre los fagos de las colonias. De este modo se identifican los clones adicionales que producen fragmentos funcionales diluidos en la biblioteca inicial.

40 La caracterización de los fragmentos de anticuerpo producidos por los clones incluye el análisis de la especificidad mediante ELISA frente a un panel de gangliósidos relacionados, el estudio del reconocimiento del tumor mediante inmunohistoquímica, la evaluación de su capacidad para ser producidos como fragmentos de anticuerpos funcionales solubles fuera del contexto de su presentación en fagos y la secuenciación completa de sus regiones variables.

45 **Ejemplos:**

En los siguientes ejemplos todas las enzimas de restricción o modificaciones utilizadas, así como los reactivos y materiales se obtuvieron de fuentes comerciales a menos que se especifique lo contrario.

50 Ejemplo 1. Obtención del anticuerpo monoclonal quimérico 14F7.

La síntesis del ADNc y la amplificación mediante PCR de las regiones variables murinas VH y VK se realizaron con la enzima Polimerasa *Vent* utilizando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción *Eco* RV-*Nhe* I para la VH, y *Eco*R V-*Sal* I para VK. Los oligonucleótidos de cambio fueron los siguientes:

55 Para VH:

Oligonucleótido 1 (híbrido en el péptido señal): 5' ggg gatatc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

Oligonucleótido 2 (híbrido en JH1): 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

Para VK:

Oligonucleótido 1 (híbrido en el péptido señal): 5' ggg gatatc cacc atg gt(at) t(tc)c (ta)ca cct cag (at)t(ac) ctt gga ctt 3'

60 Oligonucleótido 2 (híbrido en VLJ5): 5' agc gtcgac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cc 3'

Los productos de las PCR de VH y VK fueron digeridos con las enzimas de restricción *Eco* RV-*Nhe* I, para VH, y *Eco* RV-*Sal* I para VK, y se clonaron en sus respectivos vectores de expresión, PAH4604 y PAG4622, para VH y VK respectivamente. Estos vectores se utilizan para la expresión de inmunoglobulinas en células de mamíferos y fueron

donados por Sherie Morrison (UCLA, California, USA). El vector PAH4604 tiene la región constante de IgG1 humana incluida y PAG4622, una región constante kappa humana (Coloma J et al., J Immunol Methods 152: 89-104, 1992). Una vez que las regiones VH y VK de la 14F7 han sido clonadas en los vectores anteriores, se forman las construcciones 14F7VH-PAH4604 y 14F7VK-PAG4622.

Se secuenciaron doce clones independientes mediante el método del dideoxinucleótido (Sanger F et al, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS USA 1979; 74:5463-5470) utilizando el kit de secuenciación de ADN polimerasa T7 (Amersham-Pharmacia) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. Las secuencias de VH y VK tienen una alta relación con los subgrupos IIB y V, respectivamente, (Figuras 1 A y B) de acuerdo con la clasificación de Kabat (Kabat E, Sequences of proteins of immunological interest, quinta edición, National Institute of Health, 1991).

Las células NS0 se sometieron a electroporación con 10 µg de 14F7VH-PAH4604 y 10 µg de 14F7VK-PAG4622 linealizados con la enzima *Pvu* I. Los ADN se precipitaron con etanol, se mezclaron y se disolvieron en 50 µl de PBS. Se recogieron aproximadamente 10⁷ células cultivadas hasta la semiconfluencia mediante centrifugación y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS junto con el ADN en la bandeja de electroporación. Después de 10 minutos en hielo las células se sometieron a un pulso de 200 V y 960 F y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos en medios selectivos Modificados de Dulbecco (DMEM-F12) con FCS al 10% y 10 mM de L-histidinol. Los clones transfectados se visualizan 10 días después de añadir el medio de selección. La producción de la inmunoglobulina quimérica se determina mediante ELISA utilizando sobrenadantes de los clones. Para esto se recubren placas de poliestireno (de alta unión, Costar) con suero anti-IgG humana de cabra (Sigma) en tampón carbonato-bicarbonato 100 mM, pH 9,8, toda la noche a 4°C. Las placas se lavan a continuación con PBS-Tween (solución salina tamponada con fosfato, Tween-20 al 0,5%, pH 7,5), y se añaden y se incuban durante una hora a 37°C las muestras de sobrenadante de cultivo diluido en PBS-Tween-FCS. Las placas se lavan de nuevo en PBS-Tween y a continuación se incuban en suero anti-cadena kappa humana de cabra conjugada con peroxidasa (Jackson), durante una hora a 37°C. Más tarde las placas se lavan de la misma manera y se incuban con una disolución tampón de citrato-fosfato de pH 4,2 que contiene el sustrato: o-fenilendiamina. Después de 15 minutos, se mide la absorción a 492 nm.

Ejemplo 2. Reactividad del anticuerpo 14F7Q contra los anticuerpos para NGcGM3 y NAcGM3.

La reactividad del anticuerpo quimérico 14F7 (Ab) se determinó mediante un ELISA competitivo. La Figura 2 muestra la especificidad de 14F7 quimérico en comparación con 14F7 murino en el reconocimiento de placas de poliestireno Polysorp, Nunc) recubiertas con el gangliósido N-glicosilado GM3. Ambos Ab muestran, a una concentración similar una inhibición del reconocimiento del antígeno de 50% por el Ab 14F7 biotinilado murino. Aunque no se observó inmunorreactividad cuando se recubrieron las placas con la variante N-acetilada de GM3 para ninguno de los anticuerpos. El Mab C5 murino fue utilizado como Ab irrelevante.

Ejemplo 3. Obtención de diferentes versiones del anticuerpo humanizado.

Las secuencias VH y VK de 14F7 se compararon con la base de datos de secuencias humanas obteniendo la secuencia humana más homóloga del anticuerpo 14F7 para las regiones VH y VK (Fig. 1A y B). Adicionalmente, en ambas secuencias se determinaron las regiones anfipáticas o los epítotos T potenciales. Más tarde las mutaciones necesarias para convertir las secuencias de VH y VK murinas en secuencias humanas se determinaron siguiendo el método de humanización de epítotos T. Los autores de la presente invención se refieren más abajo a las máximas mutaciones posibles que se pueden realizar.

En el caso de la región VH, se introdujeron mutaciones en las posiciones 5, 9, 11, 12, 18, 19, 20, 38, 40, 42 y 48, donde los aminoácidos Q, N, L, A, M, K, M, K, R, D e I se sustituyeron por V, A, V, V, V, R, V, R, A, G y V, respectivamente. Estas mutaciones se realizaron mediante solapamiento de los productos de PCR (Kamman M et al., Nucleic Acids Research 17: 5404-5410, 1989), utilizando los oligonucleótidos 1 y 2, y 3 y 4, en las primeras PCR, y los resultados se solaparon en otra PCR usando los oligonucleótidos 2 y 4. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación:

Oligonucleótidos para las mutaciones 5, 9, 11 y 12, de la cadena pesada:

Oligonucleótido 1: 5' gtc cag ctt gtg cag tct ggg gct gaa gtg gta aaa cct ggg 3'

Oligonucleótido 2: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

Oligonucleótido 3: 5' ccc agg ttt tac cac ttc agc ccc aga ctg cac aag ctg gac 3'

Oligonucleótido 4: 5' ggg gatatac cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

Una vez secuenciadas y verificadas las mutaciones anteriores, se introdujeron mutaciones en las posiciones 18, 19 y 20 en los ADN que las portaban, sustituyendo los aminoácidos M, K, M por V, R, V, respectivamente.

A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2 y 3 y 4, descritos para dichas mutaciones. El solapamiento de los productos de las PCR se realizó como se ha descrito anteriormente.

Oligonucleótido para las mutaciones 18, 19 y 20 de la cadena pesada:

Oligonucleótido 1: 5' ggg gcc tca gtg agg gtg tcc tgc agg 3'

Oligonucleótido 2: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

Oligonucleótido 3: 5' cct gca gga cac cct cac tga ggc ccc 3'

5 Oligonucleótido 4: 5' ggg gata^tc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

Del mismo modo una vez secuenciadas y verificadas las mutaciones anteriores, se introdujeron las mutaciones R, A, G en las posiciones 38, 40 y 42 en los ADN que las portaban, sustituyendo los aminoácidos K, R, D, respectivamente.

10 A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2, y 3 y 4, descritos para estas mutaciones. El solapamiento de los productos de las PCR se realizó como se ha descrito anteriormente.

Oligonucleótidos para las mutaciones 38, 40 y 42 de la cadena pesada:

Oligonucleótido 1: 5' cac tgg tta aga cag gca cct ggc cag ggt ctg 3'

15 Oligonucleótido 2: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

Oligonucleótido 3: 5' cag acc ctg gcc agg tgc ctg tct taa cca gtg 3'

Oligonucleótido 4: 5' ggg gata^tc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

20 Finalmente después de verificar mediante la secuencia las mutaciones anteriores, se introdujo una mutación en la posición 48 en los ADN que las portaban sustituyendo el aminoácido I por V. A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2, y 3 y 4, que se utilizan en esta mutación. El solapamiento de los productos de las PCR se realizó como se ha descrito anteriormente.

Oligonucleótidos para la mutación 48 de la cadena pesada:

25 Oligonucleótido 1: 5' ctg gga tgg gtt gga tac att 3'

Oligonucleótido 2: 5' ggg gctagc tga gga gac ggt gac cgt ggt 3'

Oligonucleótido 3: 5' aat gta tcc aac cca ttc cag 3'

Oligonucleótido 4: 5' ggg gata^tc cacc atg gaa agg cac tgg atc ttt ctc ttc ctg 3'

30 Todas estas mutaciones fueron verificadas mediante la secuencia. La construcción genética obtenida se denominó 14F7hTVH.

35 En el caso de la cadena pesada hay diferentes aminoácidos entre VH14F7 y la humana más similar que no se llevaron a cabo debido a que estas sustituciones implicaban aminoácidos de la zona Vernier o son posiciones clave en el reconocimiento del antígeno.

Para la cadena ligera, se llevaron a cabo mutaciones en las posiciones 39, 40, 41, 42 y 58, sustituyendo R, T, H, E, I, por K, P, G, Q, y V, respectivamente. Las mutaciones se introdujeron en la misma manera que en la cadena pesada. Más abajo se describen las secuencias de oligonucleótido utilizadas.

40 Oligonucleótidos para las mutaciones 39, 40, 41, y 42 de la cadena ligera.

Oligonucleótido 1: 5' tat caa caa aaa cca ggt cag tct cca agg 3'

Oligonucleótido 2: 5' agc gtcgac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cc 3'

Oligonucleótido 3: 5' cct tgg aga ctg acc tgg ttt ttg ata 3'

45 Oligonucleótido 4: 5' ggg gata^tc cacc atg g^t(at) t^t(tc)c (ta)ca cct cag (at)t(ac) ctt gga ctt 3'

50 Después de verificar mediante la secuencia las mutaciones anteriores, se introdujo una mutación en la posición 58 en los ADN que las portaban sustituyendo el ácido amino I por V. A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2, y 3 y 4, utilizados en esta mutación. El solapamiento de los productos de las PCR se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

Oligonucleótidos para la mutación 58 de la cadena ligera:

Oligonucleótido 1: 5' att tct ggg gtc ccc tcc agg 3'

Oligonucleótido 2: 5' agc gtcgac tta cgt ttc agc tcc agc ttg gtc cc 3'

55 Oligonucleótido 3: 5' cct gga ggg gac ccc aga aat 3'

Oligonucleótido 4: 5' ggg gata^tc cacc atg g^t(at) t^t(tc)c (ta)ca cct cag (at)t(ac) ctt gga ctt 3'

Una vez que se llevó a cabo la mutación esta se verificó mediante la secuencia.

60 La construcción genética resultante se denominó 14F7hTVK.

Las regiones VK y VH humanizadas fueron clonadas en los vectores PAG4622 y PAH4604, formando las construcciones 14F7hTVH-PAH4604 y 14F7hTVK-PAG4622, respectivamente. Las células NSO se sometieron a electroporación con 10 µg de cada vector que portaba las regiones variables humanizadas 14F7hTVH-PAH4604 y

14F7hTVK-PAG4622, previamente linealizadas mediante digestión con *Pvu* I. El proceso de electroporación y la detección de los clones que expresaban el anticuerpo humanizado 14F7hT fueron idénticos a los descritos para el anticuerpo quimérico.

5 Ejemplo 4: Efecto del Ab 14F7 sobre la reducción del crecimiento tumoral en el modelo de angiogénesis *in vivo*

La línea de células tumorales B16 de melanoma mezclada con gel de la matriz como inductor de la angiogénesis se utilizó como modelo para la angiogénesis *in vivo*

10 Con la implantación subcutánea de la línea tumoral (B16) con el gel de la matriz en la línea ventral media de ratones macho C57/BL6, se midió la inducción de los procesos de angiogénesis tumorales. Para ello, se mezclaron las células B16 de melanoma con 0,5 ml de gel de la matriz y 64 unidades/ml de heparina, solos, en el grupo de control, o combinados con otros anticuerpos, que se van a administrar mediante inyección subcutánea en la región abdominal de los animales. Quince días después de la inoculación se sacrificaron los animales y se extrajeron perlas de gel junto con los residuos de la dermis y la epidermis y el tamaño del tumor se examinó macroscópicamente. La Figura 3 muestra cómo el tamaño de la masa tumoral de los tumores de los ratones tratados con 14F7 disminuyó drásticamente.

20 Para distinguir los neovasos se llevó a cabo un análisis histopatológico de los geles teñidos con hematoxilina/eosina y con inmunotinción con un Mab anti-PECAM (marcador endotelial). En la Figura 4, A y B, se observa una disminución en el número de vasos sanguíneos en las secciones de tejido de los animales tratados con 14F7, en comparación con las secciones tumorales de los animales no tratados.

25 Ejemplo 5: Construcción de bibliotecas de fragmentos de anticuerpos sobre fagos filamentosos a partir de hibridoma 14F7.

30 Se aisló el ARN mensajero con TriPure Isolation Reagent (Boehringer Mannheim, Alemania) a partir de $5,0 \times 10^6$ células de hibridoma 14F7 y el ADN complementario se sintetizó con el kit de reactivos para RT-PCR Pro-STAR First Strand (Stratagene, USA). Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras derivadas del hibridoma se amplificaron mediante 26 ciclos de reacción en cadena de la polimerasa en las siguientes condiciones: 50 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C. Para esto se utilizaron todas las posibles combinaciones de un kit de oligonucleótidos degenerados (diseñados para hibridarse con una amplia variedad de regiones variables de ratones), que se muestran en la siguiente tabla:

35 Oligonucleótidos utilizados para amplificar VH y VL. Las posiciones degeneradas aparecen entre paréntesis en la secuencia de los oligonucleótidos. Se subrayan las secuencias de los sitios de restricción.

5' VH *Apa* LI
 5' ... ttc tat tct cac agt gca cag (gc)ag gt(gt) cag ct(gt) ac(ag) cag tc(at) gga 3'
 5' ... ttc tat tct cac agt gca cag gc(ag) gt(ct) ca(ag) ctg cag cag ct(ct) ggg gc 3'
 5' ... ttc tat tct cac agt gca cag ga(ag) gtg aag ct(gt) (gc)t(gc) gag tct gg(ag) gga 3'
 40 3' VH *Sfi* I
 5' ... ga acc agt act cca ggc ctg agg ggc cgc aga gac agt gac cag agt ccc 3'
 5' ... ga acc agt act cca ggc ctg agg ggc cga gga gac ggt gac tga ggt tcc 3'
 5' ... ga acc agt act cca ggc ctg agg ggc cga gga gac (gt)gt ga(gc) (ca) gt gga (gc) cc ... 3'
 5' VL *Sal* I
 45 5' ... gta ctc cag tcg acg aca ttg tg(ca) tg(at) t(ac)c agt ctc c ...3'
 5' ... gta ctc cag tcg acg ata tcc aga tga c(ac)c a(ga)a ct(ac) c ...3'
 5' ... gta ctc cag tcg ac(cg) aaa ttg t(tg)c tca ccc agt ctc c ...3'
 3' VL *Not* I
 5' ... aag gaa aaa agc ggc cgc ttt (tc)a(tg) (tc)tc cag ctt ggt ...3'
 50 5' ... aag gaa aaa agc ggc cgc ttt (tg)a(tg) ctc caa ctt gt(gt) ...3'

Las regiones variables de las cadenas pesadas amplificadas se purificaron y se digirieron sucesivamente con las enzimas de restricción *Sfi* I y *Apa*LI. Los productos de la digestión se purificaron y se conectaron con el ADN del vector fagémido PhG-1m (Heber Biotec S.A., Cuba) (Figura 5). Con las construcciones genéticas resultantes se transformaron bacterias de la cepa TG1 de *E. coli* mediante electroporación. El grupo de bacterias transformadas conformó una semi-biblioteca de regiones variables de cadenas pesadas derivadas del hibridoma 14F7 con un tamaño moderado de $2,3 \times 10^4$ miembros. El ADN plasmídico de la semi-biblioteca se purificó y se digirió sucesivamente con las enzimas *Not* I y *Sal* I. Este ADN se conectó por separado con cuatro colecciones de regiones variables de cadenas ligeras previamente digeridas con las mismas enzimas. Las bacterias de la cepa TG1 se transformaron con estas nuevas construcciones genéticas y se obtuvieron cuatro bibliotecas independientes. Una de ellas era una mini-biblioteca de diversidad limitada que contenía las regiones variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras derivadas del hibridoma 14F7 con un tamaño de $1,6 \times 10^6$ individuos. Las otras tres eran bibliotecas de intercambio de cadena que incorporaban diversas colecciones de regiones variables de cadenas ligeras obtenidas previamente a partir de ratones (isotipo kappa) y seres humanos (isotipos kappa y lambda) y sus tamaños eran de

1,0 x 10⁷, 1,4 x 10⁶ y 1,2 x 10⁶ miembros respectivamente.

Ejemplo 6: Aislamiento de clones que producen fragmentos de anticuerpos contra el N-glicolil GM3.

5 Se produjeron fagos que portaban los fragmentos de anticuerpos de 92 clones tomados al azar de cada biblioteca, en pocillos de placas de microtitulación de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (Marks, J. D. et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597.1991). Su especificidad se evaluó en un ELISA sobre placas de poli(cloruro de vinilo) (Costar, USA) recubiertas con N-glicolil GM3 y N-acetil GM3 a 1 µg/ml. Los fagos unidos se detectaron con un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con peroxidasa (Amersham, Suecia). Además de la caracterización de los clones individuales elegidos al azar, se realizó la selección de los fagos con capacidad de unión a N-glicolil GM3 de una mezcla de fagos producidos por un grupo de bacterias que conformaban cada biblioteca. Para ello, los fagos se produjeron utilizando el fago coadyuvante M13 K07, se purificaron mediante precipitación con polietilenglicol de acuerdo con el procedimiento referido y se pusieron en contacto con N-glicolil GM3 unido a una superficie de plástico (tubos Inmuno, Nunc, Dinamarca). Los tubos se lavaron exhaustivamente y los fagos se eluyeron en presencia de trietilamina 100 mmol/l. El producto eluido se neutralizó y se utilizó para infectar bacterias de la cepa TG1 de *E. coli*. A partir del grupo de bacterias infectadas se produjeron fagos que portaban el anticuerpo y se purificaron de nuevo y se utilizaron como material de partida para una nueva ronda de selección en condiciones idénticas a las descritas. Después de cuatro ciclos de selección se tomaron al azar 92 colonias de bacterias infectadas con los fagos resultantes de cada biblioteca y se llevó a cabo el reconocimiento de N-glicolil GM3 de una forma similar a la descrita para la evaluación de los clones tomados al azar de las bibliotecas.

A partir del análisis directo se aislaron los clones de las bibliotecas que producían clones de los fagos que portan los fragmentos de anticuerpo que reconocían N-glicolil GM3, que se encontraban a una frecuencia variable en las tres bibliotecas de intercambio de cadena. No se encontró ningún clon positivo en la mini-biblioteca formada exclusivamente por regiones variables derivadas del híbrido 14F7. Después de los ciclos de selección, se aislaron clones adicionales a partir de las bibliotecas de cambio de cadena y no se encontró ninguno en la mini-biblioteca de las secuencias originales. La siguiente tabla muestra la cantidad de clones que producen fragmentos de anticuerpos que reconocen N-glicolil GM3 y la frecuencia que representa el número total de clones analizados a partir de cada biblioteca. Solo un clon produjo fagos que presentaban reactividad cruzada con N-acetil GM3.

Biblioteca	Frecuencia de los clones positivos (escrutinio directo)	Frecuencia de los clones positivos (cuatro ciclos de selección)
Mini-biblioteca de híbrido 14F7	0/92	0/92
Intercambio de cadenas ligeras kappa murinas	31/92 (33,70%) *	52/92 (56,52%)
Intercambio de cadenas ligeras kappa humanas	2/92 (2,17%)	8/92 (17,39%)
Intercambio de cadenas lambda ligeras humanas	4/92 (4,35%)	12/92 (13,04%)

Clon con reactividad cruzada con N-acetil GM3.

Ejemplo 7. Caracterización de los fragmentos de anticuerpo derivados de 14F7 que reconocen N-glicolil GM3

35 Las regiones variables de 11 fragmentos de anticuerpos se secuenciaron completamente con un secuenciador automático ALF Express II (Pharmacia, Suecia), utilizando oligonucleótidos que hibridaban en las regiones del vector PhG-1m que flanquean los extremos 5' y 3' de las secuencias que codifican los fragmentos de anticuerpo insertados. Se confirmó que la secuencia de la región variable de todas las cadenas pesadas correspondía a la referida para 14F7, solo se presentaron cambios en las regiones marco 1 y marco 4, presumiblemente introducidos por el uso de oligonucleótidos degenerados en la PCR. El restablecimiento de las secuencias incluidas las tres CDR no tuvo variaciones. Por el contrario, las secuencias de las regiones variables de las cadenas ligeras de los 11 clones fueron todas diferentes de la de 14F7 y se agruparon en 5 grupos de diferentes secuencias, dos de origen murino y una de origen humano (isotipo kappa) y otras dos de origen humano, pero de isotipo lambda. Se tomó un clon representativo de cada grupo de secuencias para su posterior caracterización.

45 La siguiente tabla muestra las diferencias entre las regiones variables de las cadenas ligeras de los clones seleccionados con respecto a su identidad original, su origen e isotipo y la clasificación en subgrupos de acuerdo con la clasificación de Kabat.

	Origen VL	Isotipo	Identidad con VL14F7	Subgrupo
AcM 14F7	Murino	kappa	-	V
ScFv 2Am	Murino	kappa	59,46%	III
ScFv 3Fm	Murino	kappa	59,81%	V
ScFv 7Bhk	Humano	kappa	60,74%	I
ScFv 7Ahl	Humano	lambda	35,45%	I
ScFv 8Bhl	Humano	lambda	37,04%	III

5 Las diferencias entre las regiones variables de las cadenas ligeras de los clones y las referidas originalmente para el anticuerpo 14F7 se localizan a lo largo de toda la secuencia incluyendo las tres regiones determinantes complementarias y se muestran a continuación (Figura 6).

Fr1

```

14F7 Mab  D L V L T Q S P A T L S V T P G D S V S F S C
2Am scFv  . I . M F . . . S . A . S L . Q R A T I . .
3Fm scFv  . I Q M . . T . S S . . A S L . . R . T I . .
7Bhk scFv . I Q M . . T . S S . . A S V . . R . T I T .
7Ahl scFv Q S V V . . P . S  A . G G . . Q . L T I . .
8B hl scFv S S E L . . D . .  V . . A L . Q T . R I T .
    
```

10 **CDR 1**

```

R A S Q          S I S N N L H
. . . . S V S S . S Y S Y M .
. . . .          D . . . Y . N
. . . .          . . . S F . N
T G T S S D V   G G Y . H V S
Q G D S         L R . Y Y A S
    
```

Fr 2

```

W Y Q Q R T H E S P R L L I K
. . . . K P G Q P . K . . . .
. . . . K P D G T V K . . . V
. . . . K P G K A . K . . . Y
. . . . H P G K A . K . M . Y
. . . . K P G Q A . V . V . Y
    
```

15 **CDR 2**

```

Y A S Q S I S
. . . N L E .
. T . R L H .
A . . N L Q .
D V . K R P .
G K N N R P .
    
```

Fr 3

```

G I P S R F S G S G S G T D F T L S I I A V E T E D F G M Y F C
. V . A . . . . . . . . . . N . H P . . E . . A A T . Y .
. V . . . . . . . . . . Y S . T . S N L . Q . . I A T . . .
. V . . . . . R . . . . . T . S S L Q P . . . A A . Y .
. V . H . . . . K . . N T A S . T V S G L Q A . . E A V . Y .
. . . D . . . . . S . . N T A S . T . T G A Q A . . E A D . Y .
    
```

20

CDR 3

```

Q Q S N R W P      L T F
. H . R D V .      . . .
. . G . T L .      P . .
. . G Y T T .      . . .
S S Y A G S N N . V .
N S R D S S G N H V V .
    
```

Fr 4

```

G A G T K L E L K
. . . . . I .
. . . . . . .
. Q . . . . .
. G . . . V T V L
. G . . . . T V L
    
```

5

La especificidad de la unión se confirmó mediante ELISA de acuerdo con el método descrito utilizando como recubrimiento, además de N-glicolil GM3 y N-acetil GM3, un panel de gangliósidos relacionados que incluyen diversos gangliósidos N-acetilados y un gangliósido N-glicolilado. La Figura 7 muestra el reconocimiento de los diferentes antígenos por los 5 clones que producen fragmentos de anticuerpos caracterizados. Solo se detectó la unión al antígeno diana N-glicolil GM3.

La producción de los fragmentos de anticuerpos solubles (fuera del contexto de los fagos) por los clones fue inducida en presencia de isopropil-tiogalactopiranosido a 1 mmol/l. El sobrenadante se recogió y se obtuvieron las fracciones periplasmáticas de acuerdo con los procedimientos establecidos (de Haard, H. J. Biol. Chem. 274, 18218-18230, 1999). Se detectó actividad de reconocimiento de la N-glicolil GM3 tanto en los sobrenadantes de cultivo como en las fracciones periplasmáticas a través de un ELISA en placas recubiertas con dicho antígeno similar al descrito, pero con la siguiente modificación. Los fragmentos de anticuerpos unidos se detectaron utilizando el anticuerpo monoclonal 1E10 (dirigido contra el péptido *c-myc* fusionado en la construcción genética a los fragmentos de anticuerpo) a 10 µg/ml y un producto conjugado anti-inmunoglobulina de ratón (Sigma, USA). Los fragmentos de anticuerpo se purificaron a partir de las fracciones periplasmáticas en una sola cromatografía de afinidad con iones metálicos utilizando la matriz HIS-Select HC Nickel Affinity Gel (Sigma, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La Figura 8 muestra la actividad determinada mediante ELISA de los fragmentos solubles purificados.

Breve descripción de los dibujos.

Figura 1: Muestra la secuencia de aminoácidos de las regiones variables VH (a) y VK (b) del Mab 14F7, y la respectiva secuencia humana más homóloga. Las CDR están subrayadas y las regiones anfipáticas y los posibles epítomos T están sombreados. También se muestra la secuencia resultante de la humanización de las regiones variables con las mutaciones realizadas.

Figura 2: Reconocimiento del anticuerpo 14F7Q medido mediante ELISA competitivo.

Eje X: Expresa las concentraciones de anticuerpos.

Eje Y: absorbancia medida a 492 nm

El anticuerpo monoclonal ior C5 se utilizó como control negativo.

Figura 3: Efecto del anticuerpo monoclonal 14F7 sobre el crecimiento de tumores murinos (línea de células tumorales B16 de melanoma).

Figura 4: A) Estudio inmunohistoquímico del efecto del anticuerpo monoclonal 14F7 sobre la formación de vasos sanguíneos. Las flechas indican los vasos inmunoteñidos.

B) Inhibición de la angiogénesis inducida por el anticuerpo monoclonal 14F7.

Figura 5: Diagrama del vector pHG-1m.

Figura 6: Secuencia de proteínas de las regiones VL del anticuerpo monoclonal 14F7 y los fragmentos Fv de cadena sencilla seleccionados. Los puntos indican homología con la secuencia de la VL de 14F7.

Figura 7: Especificidad de reconocimiento por los fagos que portan los fragmentos de anticuerpos. Se observa la inhibición de la unión del Ab 14F7 al gangliósido por los fragmentos expuestos en los fagos. Las placas se recubren con N-glicolil GM3 y los fagos se incuban con partículas virales y diversas concentraciones de 14F7.

Figura 8. Reconocimiento de N-glicolil GM3 por los fragmentos purificados solubles.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
- <120> Anticuerpos recombinantes y fragmentos que reconocen el gangliósido N glicolil GM3 y su uso en el diagnóstico y tratamiento de tumores.
- 10 <130> CU 92/2003
- <140> CU 92/2003
<141> 23-04-2003
- 15 <160> 58
- <170> PatentIn versión 3.2
- 20 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
- 25 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1) ..(5)
- <400> 1
Ser Tyr Trp Ile His
1 5
- 30 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
- 35 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1) ..(17)
- <400> 2
Tyr Ile Asp Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
- 40 **Asp**
- <210> 3
<211> 16
<212> PRT
45 <213> Mus musculus
- <220>
<221> DOMINIO
<222> (1) ..(16)
- 50 <400> 3
Glu Ser Pro Arg Leu Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15
- 55 <210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
- <220>

<221> DOMINIO
 <222> (1) ..(11)

<400> 4
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
 5 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1) ..(7)

15 <400> 5
 Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

20 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1) ..(9)

30 <400> 6
 Gln Gln Ser Asn Arg Trp Pro Leu Thr
 1 5

35 <210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1) ..(30)

40 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asn Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 20 25 30

45 <210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1) ..(14)

55 <400> 8
 Trp Leu Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 9
 <211> 32

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 5 <221> DOMINIO
 <222> (1) ..(32)

<400> 9
 Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Phe Met Tyr
 1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

10 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1) ..(11)

20 <400> 10
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 11
 <211> 23

25 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMINIO
 30 <222> (1) ..(23)

<400> 11
 Asp Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Phe Ser Cys
 20

35 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1) ..(15)

<400> 12
 Trp Tyr Gln Gln Arg Thr His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
 45 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 32
 <212> PRT

50 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1) ..(32)

ES 2 535 813 T3

<400> 13
 Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Ser Ile Ile Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys
 20 25 30

5 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1) ..(12)

<400> 14
 phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 1 5 10

15 <210> 15
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> cadena transcrita primaria
 <222> (1) ..(43)

25 <400> 15
 ggggatatcc accatggaaa ggcactggat cttttcttc ctg 43

30 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

35 <220>
 <221> cadena transcrita primaria
 <222> (1) ..(30)

40 <400> 16
 ggggctagct gaggagacgg tgaccgtgt 30

45 <210> 17
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> cadena transcrita primaria
 <222> (1) ..(48)

50 <220>
 <221> cadena transcrita primaria
 <222> (1) ..(43)
 <400> 17
 ggggatatcc accatggtat ttctacacc tcagattacc ttggactt 48

55 <210> 18
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

ES 2 535 813 T3

<220>
 <221> cadena transcrita primaria
 <222> (1) ..(35)

5 <400> 18
 agcgtcgact tacgtttcag ctccagcttg gtccc 35

<210> 19
 <211> 42
 10 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> cadena transcrita primaria
 15 <222> (1) ..(42)

<400> 19
 gtccagcttg tgcagtctgg ggctgaagtg gtaaacctg gg 42

20 <210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> cadena transcrita primaria
 <222> (1) ..(30)

30 <400> 20
 ggggctagct gaggagacgg tgaccgtggt 30

<210> 21
 <211> 42
 <212> ADN
 35 <213> Mus musculus

<220>
 <221> cadena transcrita primaria
 <222> (1) ..(42)

40 <400> 21
 cccaggtttt accacttcag ccccagactg cacaagctgg ac 42

<210> 22
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> cadena transcrita primaria
 <222> (1) ..(43)

<400> 22
 50 ggggatatcc accatggaaa ggactggat ctttctctc ctg 43

<210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

60 <220>
 <221> cadena transcrita primaria
 <222> (1) ..(27)

	<400> 23 ggggcctcag tgagggtgc ctgcagg	27
5	<210> 24 <211> 30 <212> ADN <213> Mus musculus	
10	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(30)	
15	<400> 24 ggggctagct gaggagacgg tgaccgtggt	30
20	<210> 25 <211> 27 <212> ADN <213> Mus musculus	
25	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(27)	
30	<400> 25 cctgcaggac accctcactg aggcccc	27
35	<210> 26 <211> 43 <212> ADN <213> Mus musculus	
40	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(43)	
45	<400> 26 ggggatatcc accatggaaa ggcactggat ctttctctc ctg	43
50	<210> 27 <211> 33 <212> ADN <213> Mus musculus	
55	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(33)	
60	<400> 27 cactggtaa gacaggcacc tggccagggt ctg	33
65	<210> 28 <211> 30 <212> ADN <213> Mus musculus	
70	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(30)	
75	<400> 28 ggggctagct gaggagacgg tgaccgtggt	30
80	<210> 29	

	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
5	<220>	
	<221> cadena transcrita primaria	
	<222> (1) ..(33)	
	<400> 29	
10	cagaccctgg ccaggtgcct gtcttaacca gtg	33
	<210> 30	
	<211> 43	
	<212> ADN	
15	<213> Mus musculus	
	<220>	
	<221> cadena transcrita primaria	
	<222> (1) ..(43)	
20	<400> 30	
	ggggatatcc accatggaaa ggactggat ctttctctc CTG	43
	<210> 31	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<220>	
30	<221> cadena transcrita primaria	
	<222> (1) ..(21)	
	<400> 31	
35	ctggaatggg ttgatacat t	21
	<210> 32	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
40	<220>	
	<221> cadena transcrita primaria	
	<222> (1) ..(30)	
45	<400> 32	
	ggggctagct gaggagacgg tgaccgtggt	30
	<210> 33	
	<211> 21	
50	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
	<220>	
	<221> cadena transcrita primaria	
55	<222> (1) ..(21)	
	<400> 33	
	aatgtatcca acccattcca g	21
60	<210> 34	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	

	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(43)	
5	<400> 34 ggggatatcc accatggaaa ggcactggat ctttctcttc ctg	43
	<210> 35 <211> 30 <212> ADN <213> Mus musculus	
10	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(30)	
15	<400> 35 tatcaacaaa aaccaggtca gtctccaagg	30
20	<210> 36 <211> 35 <212> ADN <213> Mus musculus	
25	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(35)	
30	<400> 36 agcgtcgact tacgtttcag ctccagcttg gtccc	35
35	<210> 37 <211> 30 <212> ADN <213> Mus musculus	
40	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(30)	
45	<400> 37 ccttgagac tgacctgggt tttgtgata	30
50	<210> 38 <211> 48 <212> ADN <213> Mus musculus	
55	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(48)	
60	<400> 38 ggggatatcc accatggtat ttctacacc tcagattacc ttgactt	48
	<210> 39 <211> 21 <212> ADN <213> Mus musculus	
60	<220> <221> cadena transcrita primaria <222> (1) ..(21)	

ES 2 535 813 T3

<400> 39
atttctgggg tcccctccag g 21

5 <210> 40
<211> 35
<212> ADN
<213> Mus musculus

10 <220>
<221> cadena transcrita primaria
<222> (1) ..(35)

15 <400> 40
agcgtcgact tacgtttcag ctccagcttg gtccc 35
<210> 41

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado recombinante que reconoce el gangliósido NGcGM3 que comprende la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana y la región constante de la cadena ligera Ck humana y las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal 14F7 murino producido por el hibridoma con el depósito de ECACC 98101901, en donde el anticuerpo monoclonal 14F7 murino comprende las secuencias de las regiones hipervariables (CDR) de las cadenas pesadas y ligeras mostradas a continuación:

CADENA PESADA

CDR1: SYWIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

CADENA LIGERA

CDR1: RASQSSNNLH

CDR2: YASQSS

CDR3: QQSNRWPLT;

y el anticuerpo monoclonal 14F7 murino comprende las secuencias de las regiones marco (FR) de las cadenas pesadas y ligeras mostradas a continuación:

CADENA PESADA

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT

FR2: WLKQRPDQGLEWIG

FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS

CADENA LIGERA

FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC

FR2: WYQQRTHESPRLLIK

FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFC

FR4: FGAGTKLELKRA;

en donde el anticuerpo humanizado recombinante está caracterizado porque contiene la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal 14F7 murino y una región variable de cadena ligera cuya secuencia es la siguiente:

Fr1

DIQMTQTPSSLSASLGDRVITISC

CDR1

RASQDISNYLN

Fr2

WYQQKPDGTVKLLIV

CDR 2

YTSRLHS

Fr3

GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC

CDR 3

QQGNTLPPTF

Fr4

GAGTKLELK

o:

Fr1

DIQMTQTPSSLSASVGDRTITC

CDR1

RASQSISFLN

Fr2

WYQQKPGKAPKLLIY

CDR 2

AASNLSQS

Fr3
GVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFAAYYC

5 CDR 3
QQGYTTPLTF

10 Fr4
GQGTKLELK

o:

15 Fr1
QSVVTQPPSASGGPGQSLTISC

CDR 1
TGTSSDVGGYNHVS

20 Fr2
WYQQHPGKAPKLLMIY

25 CDR 2
DVSKRPS

Fr3
GVPHRFSGSGKSGNTASLTVSGLQAEDEAVYYC

30 CDR 3
SSYAGSNNLVF

Fr4
GGGTKVTVL

35 2. Un fragmento Fv de cadena sencilla que reconoce el gangliósido NGcGM3 derivado del anticuerpo monoclonal 14F7 murino producido por el hibridoma con el número de depósito ECACC 98101901 caracterizado porque contiene la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 14F7 y una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo murino, cuya secuencia es la siguiente:

40 Fr1: DIQMTQTPSSLSASLGDRVTISC
CDR 1: RASQDISNYLN
Fr2: WYQQKPDGTVKLLIV
CDR2: YTSRLHS
Fr3: GVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFAAYYC
45 CDR3: QQGNTLPPTF
Fr4: GAGTKLELK,

o

50 Fr1: DIQMTQTPSSLSASVGDRTITC
CDR1: RASQSISSFLN
Fr2: WYQQKPGKAPKLLIY
CDR2: AASNLSQS
Fr3: GVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFAAYYC
55 CDR3: QQGYTTPLTF
Fr4: GQGTKLELK,

o

60 Fr1: QSVVTQPPSASGGPGQSLTISC
CDR1: TGTSSDVGGYNHVS
Fr2: WYQQHPGKAPKLLMIY
CDR2: DVSKRPS
Fr3: GVPHRFSGSGKSGNTASLTVSGLQAEDEAVYYC

CDR3: SSYAGSNLNVF
Fr4: GGGTKVTVL.

- 5 3. Una línea celular que expresa el anticuerpo recombinante o el fragmento de Fv de cadena sencilla de las reivindicaciones 1 o 2.
4. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de tumores malignos que comprende el anticuerpo recombinante o el fragmento de Fv de cadena sencilla de las reivindicaciones 1 o 2, y un excipiente apropiado.
- 10 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de tumores de mama y melanomas malignos y sus metástasis y recidivas.

FIGURA 1:

A)

	10	20	30	40	50	60
VH 14f7	<u>QVQBOQSGNELKPKGASMKM</u> SCRASGYSFTSYWLIHWLKRREDSLEWIGYIDPATAYTESNOKF					
VH humana	.T..V...A.VR....VRV..K....T.IDSY...IR.A.GH....V.W.N.NSGG.NYAPR.					
VH 14f7hTQ...A.VV....VRV.....R.A.G....V.....					
	70	80	90	100	110	
VH 14f7	<u>KDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESP---</u> RLRGIYYWAMDYWGQGTVMIVSS					
VH humana	QGRVTM.R.A.FS..Y.D.R..R.D....F...KSD.FWSDYYNFD.S.TL.V.....					
VH 14f7hT					

B)

	10	20	30	40	50	60
VK 14f7	<u>DLVLTQSPATLSVTPGDVSVF</u> <u>SCRASQSTSNNEHWYQORTHESEPRDEIQAASQSKSGTSPSRQSG</u>					
VK humana	.IQM.Z..SS..ASV.BR.TIT....ZT..SY.B..ZZKPGKA.B...YA..BLH..V.....					
VK 14f7hTRTHE.....V.....					
	70	80	90	100		
VK 14f7	<u>SGSGT</u> DFTLSIISVETEDFGMYFCQSNRWPLTFGAGTKLELKRA					
VK humanaB..FT.S.LZPZB.AT.Y.ZZ.Y.S.T...Z..R.ZI...					
VK 14f7hT					

FIGURA 2:

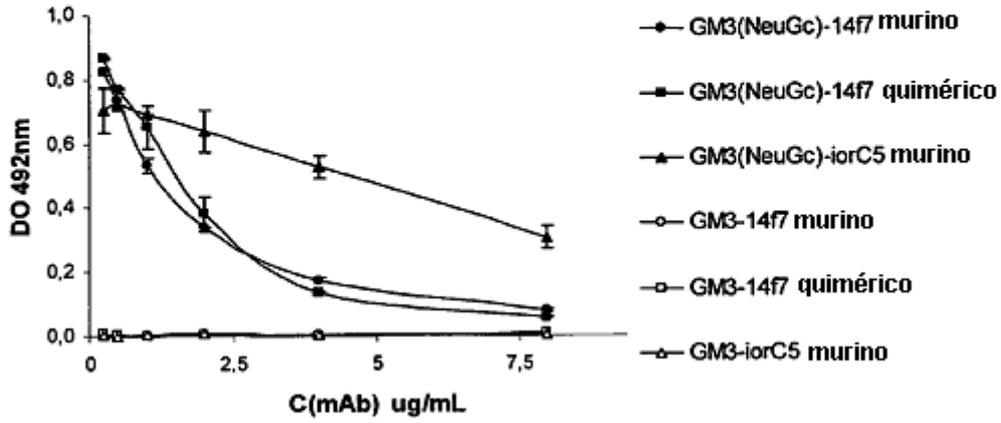
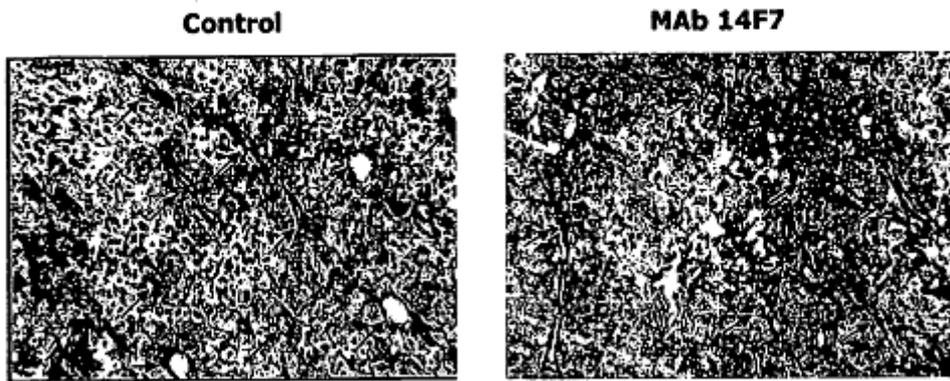


FIGURA 3:



FIGURA 4:

A)



B)

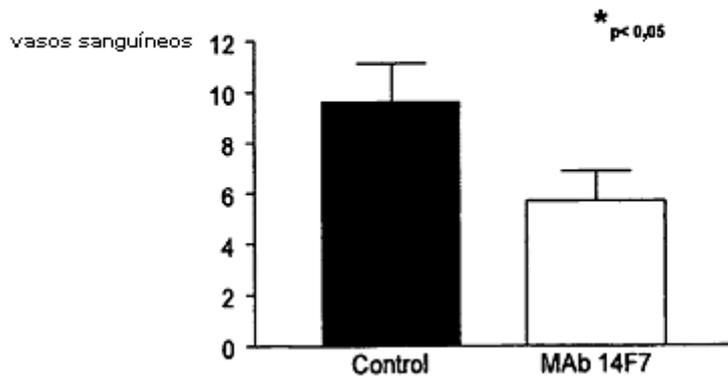


FIGURA 5:

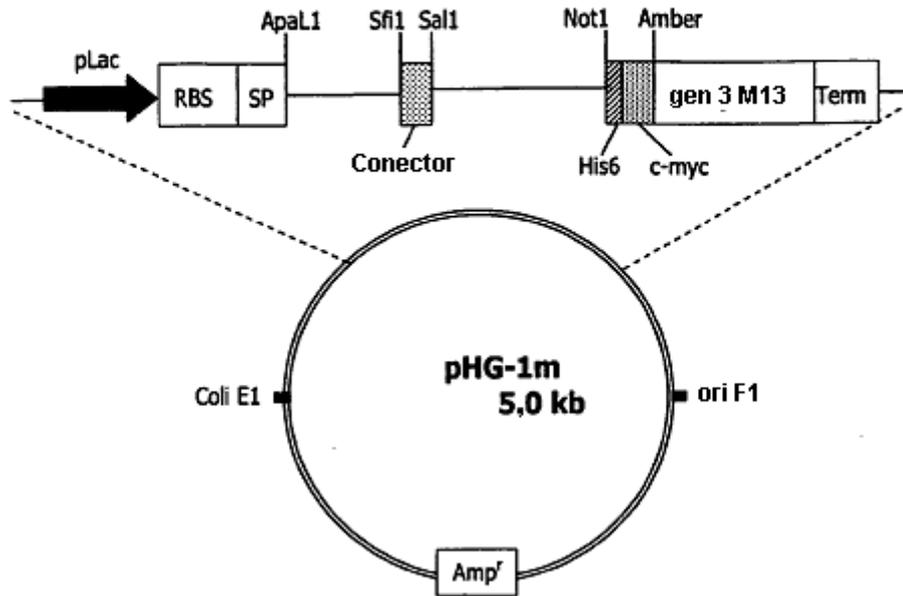


FIGURA 6:

	fr1		CDR1	
14F7 Mab	D L V L T Q S P A T L S V T P G D S S V S F S C		R A S Q	S I S N N L H
2Am scFv	. I . M F . . . S . A . S L . Q R A T I S V S S .	S Y S Y M . N
3Fm scFv	. I Q M . . T . S S . . A S L . . R . T I	D Y . N
7BhK scFv	. I Q M . . T . S S . . A S V . . R . T I . T S F . N
7AhI scFv	Q S V V . . P . S . A . . G G . . Q . L T I . . .		T G T S S D V	G G Y . H V S
8BhI scFv	S S E L . . D . . V . . A L . . Q T . R I T . .		Q G D S	L R . Y Y A S
	fr2	CDR2	fr3	
W Y Q Q R T H E S P R L L I K	Y A S Q S I S	G I P S R F S G S G S G T D F		
. . . . K P G Q P . K V	. . . N L E .	. V . A Y		
. . . . K P D G T V K Y	. T . R L L H .	. V Y		
. . . . K P G K A . K Y	A . . N L L Q .	. V R N T A		
. . . . H P G K A . K . M . . Y	D V . K R P H K N T A		
. . . . K P G Q A . V . V . . Y	G K N N R P D S N T A		
	fr3	CDR3	fr4	
T L S I I A V E T E D F G M Y F C	Q Q S N R W P	L T F	G A G T K L E L K	
. . N . H P . . E . . A A T . . Y .	. H . R D V I	
S . T . S N L . Q . . I A T G . T L .	P	
. . T . S S L Q P . . . A A . . Y .	. . G Y T T	Q V T V L	
S . T V S G L Q A . . E A D . . Y .	S S Y A G S N N	. V G T V L	
S . T . T G A Q A . . E A D . . Y .	N S R D S S G N H V V G T V L	

FIGURA 7:

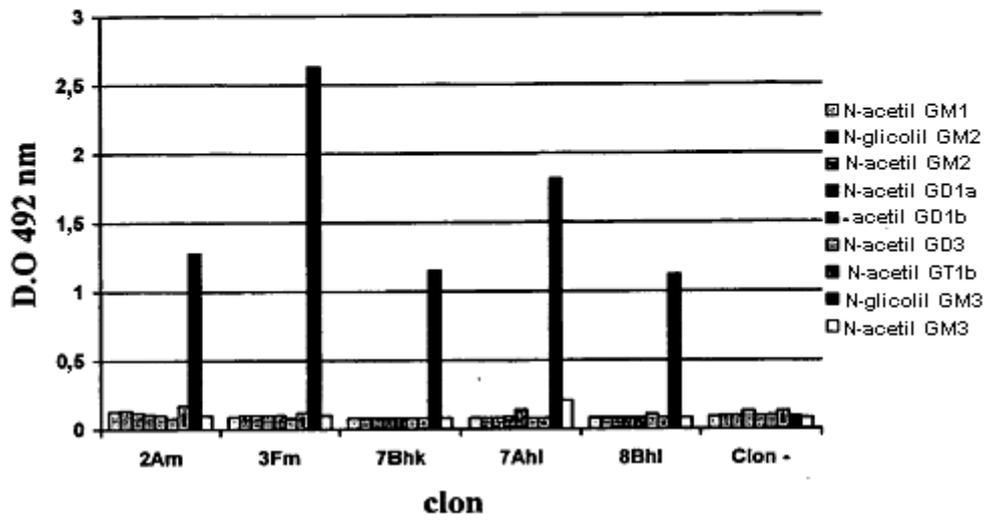


FIGURA 8.

