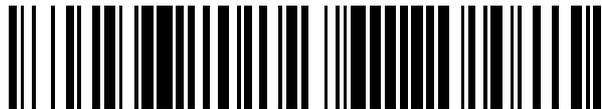


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 757**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008** **E 08863057 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015** **EP 2245063**

54 Título: **Anticuerpos que reconocen un epítipo que contiene carbohidratos en CD43 y ACE expresados en células cancerosas y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**18.12.2007 US 14716 P**

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

**12.11.2015**

73 Titular/es:

**BIOALLIANCE C.V. (100.0%)  
Strawinskylaan 3105  
1077 ZX Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**LIN, SHIH-YAO;  
LIN, LEEWEN y  
TSAI, YU-YING**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 550 757 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**

Anticuerpos que reconocen un epítipo que contiene carbohidratos en CD43 y ACE expresados en células cancerosas y métodos de uso de los mismos

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos nº de serie 61/014,716, presentada el 18 de diciembre del 2.007.

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos y humanizados) que reconocen un epítipo que contiene carbohidratos en CD43 y en el antígeno carcinoembrionario (ACE) expresado en células tumorales o cancerosas no hematopoyéticas. Estos anticuerpos tienen la propiedad de inducir la muerte celular (por ejemplo, apoptosis) en estas células tumorales o cancerígenas no hematopoyéticas en ausencia de conjugación con citotoxinas y de función inmunoeffectora. Estos anticuerpos son útiles como agentes de diagnóstico y terapéutico.

**Antecedentes de la invención**

20 La molécula CD43 (también denominada sialoforina o leucosialina), sumamente sialilada, se expresa a altos niveles en la mayoría de los leucocitos humanos, incluyendo todas las células T y plaquetas con un peso molecular que varía de 115.000 a 135.000. La expresión de CD43 es defectuosa en células T de hombres con el síndrome de Wiskott-Aldrich, un trastorno inmunodeficiente recesivo ligado al cromosoma X (Remold-O'Donnell et al. (1987) Blood 70(1):104-9; Remold-O'Donnell et al. (1984) J. Exp. Med. 159:1705-23).

25 Estudios funcionales demostraron que el anticuerpo monoclonal anti-CD43 estimulaba la proliferación de linfocitos T de sangre periférica (Mentzer et al. (1987) J. Exp. Med. 1;165 (5):1383-92; Park et al., (1991) Nature, 350:706-9) y la activación de monocitos (Nong et al. (1989) J. Exp. Med. 1:170(1):259-67). Un anticuerpo monoclonal anti-CD43 L11, bloquea la unión de células T a nódulos linfáticos y a las HEV (véculas de endotelio alto) de las placas de Peyer. El anticuerpo L11 inhibe el extravase de células T desde la sangre al interior de tejidos linfoides secundarios organizados (McEvoy et al. (1997) J. Exp. Med. 185:1493-8). Los anticuerpos monoclonales que reconocen la molécula CD43 inducen la apoptosis de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de médula ósea, de linaje marcador-negativo, que expresan CD43 a una alta densidad (Bazil et al. (1996) Blood, 87(4):1272-81.) y de células T linfoblastoides humanas (Brown et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:27686-95). Recientes estudios indican adicionalmente que CD43 actúa como un ligando para la E-selectina en células T humanas (Matsumoto et al. (2005) J. Immunol. 175:8042-50; Fuhlbrigge et al. (2006) Blood, 107:1421-6).

40 De manera interesante, los científicos también han descubierto que determinadas células tumorales no hematopoyéticas, especialmente adenocarcinomas colorrectales, expresan moléculas CD43 en la superficie celular. Santamaria et al. (1996) Cancer Research, 56:3526-9; Baeckstrom et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:13688-92; Baeckstrom et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:11503-9; Sikut et al. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 238:612-6. Se ha demostrado que los glucanos expresados sobre CD43 en una línea de células de carcinoma de colon (COLO 205) son diferentes de los de CD43 de leucocitos (Baeckstrom et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:115 03 -9). Aunque se ha sugerido que la sobreexpresión de CD43 ocasiona la activación de la proteína supresora tumoral p53 (Kadaja et al. (2004) Oncogene 23:2523-30) y que suprime un subconjunto de genes diana de NF-kappaB, parcialmente mediante la inhibición de la actividad transcripcional de p65 (Laos et al. (2006) Int. J. Oncol. 28:695-704), aún se desconoce la evidencia directa que demuestre la función causal de CD43 en la tumorigénesis de colon. El uso del anticuerpo convencional anti-CD43 como agente terapéutico para células tumorales no hematopoyéticas no es práctico debido a su fuerte unión a células T tanto inmunitarias como tumorales. Continua habiendo una necesidad de generar anticuerpos que se unan específicamente a CD43 que se expresen en células tumorales o cancerígenas no hematopoyéticas, pero que no se unan a CD43 expresado en leucocitos u otras células de origen hematopoyético. Estos anticuerpos pueden ser útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer no hematopoyético que expresa CD43.

55 El ACE se expresa normalmente en varios tejidos epiteliales glandulares (tales como los tractos gastrointestinal, respiratorio, y urogenital) donde parece estar localizado en la superficie apical de las células (Hammarstrom, S. (1999) Semin. Cancer Biol. 9, 67-81.). En tumores que surgen de estos tejidos, existe un nivel creciente de expresión del ACE que se extiende desde el dominio de la membrana apical a toda la superficie celular, junto con secreción de la proteína en la sangre (Hammarstrom, S. (1999) Semin. Cancer Biol. 9, 67-81.). La expresión excesiva del ACE se observó en muchos tipos de cánceres, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer pulmonar, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer mamario y cáncer tiroideo. Por lo tanto, el ACE se ha usado como un marcador tumoral y desde hace tiempo se han estado utilizando clínicamente ensayos inmunológicos para medir la cantidad elevada de ACE en la sangre de pacientes con cáncer en el pronóstico y tratamiento de cánceres (Gold P, et al. (1965) J. Expl. Med. 122:467-81; Chevinsky, A. H. (1991) Semin. Surg. Oncol. 7, 162-166; Shively, J. E. et al., (1985) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2, 355-399).

65

Lo que es más importante, el ACE se ha convertido en un antígeno, potencialmente útil, asociado a tumores, para la terapia dirigida (Kuroki M, et al. (2002) *Anticancer Res* 22:4255- 64). Se han desarrollado dos estrategias principales usando el ACE como una diana para la inmunoterapia contra el cáncer. Un método es el direccionamiento específico de genes suicidas (gen de la óxido nítrico sintasa (iNOS)) (Kuroki M. et al., (2000) *Anticancer Res.* 20(6A):4067-71) o isotipos (Wilkinson R W. et al., (2001) *PNAS USA* 98, 10256-60, Goldenberg, D. M. (1991) *Am. J. Gastroenterol.*, 86: 1392-1403, Olafsen T. et al., *Protein Engineering, Design & Selection*, 17, 21-27, 2004) contra células tumorales que expresan el ACE mediante anticuerpos anti-ACE. Este método también se ha extendido al uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos conjugados con agentes terapéuticos, tales como fármacos, toxinas, radionucleótidos, inmunomoduladores o citocinas. El otro método es utilizar actividades citolíticas inmunológicas, especialmente a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) para eliminar células tumorales que expresen el ACE (Imakiire T et al., (2004) *Int. J. Cancer:* 108, 564-570). Estos métodos a menudo dan lugar a liberaciones de citocina que dan como resultado efectos secundarios sistémicos.

Se han descrito anticuerpos que reconocen un epítipo que contiene carbohidratos presentes en CD43 y ACE expresados en células cancerosas no hematopoyéticas en la solicitud de patente de Estados Unidos Pub. nº 2008/0171043, Santamaria et al. (1996) *Cancer Res.*, 56(15): 3526-3529) y en el documento PCT WO 07/146172. Estos anticuerpos pueden inducir la apoptosis en estas células cancerosas no hematopoyéticas en ausencia de conjugación con citotoxinas y de función inmunoefectora.

### Breve resumen de la invención

La invención proporciona anticuerpos como se define en las reivindicaciones (por ejemplo, anticuerpos quiméricos y humanizados), que se unen específicamente a un epítipo en CD43 y/o ACE expresados por una célula cancerosa no hematopoyética, pero que no se unen específicamente a una CD43 expresada por un leucocito o por una célula Jurkat, y que son capaces de inducir la apoptosis de la célula cancerosa no hematopoyética después de la unión al epítipo expresado sobre la superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética en ausencia de conjugación con citotoxinas y de función inmunoefectora, en la que el epítipo comprende un carbohidrato, y la unión del anticuerpo con el epítipo se inhibe mediante un carbohidrato que comprende una estructura Le<sup>a</sup>, una Le<sup>a</sup>-lactosa, una estructura LNDFH II, o una estructura LNT. En algunas realizaciones, el epítipo al cual se unen los anticuerpos es sensible a fucosa.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados derivados del anticuerpo murino m5F1 que tienen al menos una inserción, delección o sustitución de aminoácido en la región bisagra de la región constante de cadena pesada.

En algunas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos aislados que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en la que (a) la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y una región constante de cadena pesada de la IgG1 humana, en la que la región bisagra de la región constante de cadena pesada comprende al menos una inserción, delección o sustitución de aminoácidos; y (b) la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y una región constante de cadena ligera de la cadena ligera kappa humana o una región constante de cadena ligera de la cadena ligera kappa humana que comprende al menos una inserción, delección o sustitución de aminoácidos, como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 27 o SEC ID N°: 29.

Uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos pueden insertarse en el N terminal en el aminoácido K218 en la región bisagra de la IgG1 humana, en el que la numeración del resto es la del sistema de numeración de EU. Véase Burton, *Mol. Immunol.* 22:161-206, 1985. Los restos de aminoácidos KSD pueden insertarse en el N terminal del aminoácido K218.

En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden: (a) una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 11-30; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 10 y 31-37 como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. La región variable de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 1, 3 y 87-91. La región variable de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 2, 4 y 92-96.

La región variable de cadena pesada del anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de los restos 20-137 de la SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 1 o

SEC ID N°: 3. La región variable de cadena ligera del anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de los restos 20-131 de la SEC ID N°: 2, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 2, la secuencia de aminoácidos de los restos 21-132 de la SEC ID N°: 4, o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 4.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-137 de la SEC ID N°: 1 o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 1, y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 27, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-131 de la SEC ID N°: 2 o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 2, y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-137 de la SEC ID N°: 1 o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 1, y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 29, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-131 de la SEC ID N°: 2 o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 2, y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 34.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-137 de la SEC ID N°: 1 o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 1, y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 29, y la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-131 de la SEC ID N°: 2 o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 2, y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 35.

30 En el presente documento también se describen fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en el presente documento.

35 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y un transportador farmacéuticamente aceptable.

40 La invención proporciona polinucleótidos y vectores que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena pesada del anticuerpo descrito en el presente documento y/o una cadena ligera del anticuerpo descrito en el presente documento o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, los polinucleótidos y los vectores comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 11-30. En algunas realizaciones, los polinucleótidos y los vectores comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 10 y 31-37.

50 La invención también proporciona células hospedadoras que comprenden los polinucleótidos y los vectores descritos en el presente documento.

55 La invención proporciona adicionalmente métodos para producir cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. Los métodos pueden comprender la etapa de expresar uno o más polinucleótidos que codifican los anticuerpos (que pueden expresarse por separado como una sola cadena pesada o ligera o expresarse como una cadena tanto ligera como pesada de un vector) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en células hospedadoras adecuadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos expresados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se recuperan y/o se aíslan. La invención también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno producidos por los métodos.

60 La invención proporciona uno o más anticuerpos de la invención para su uso en un método para el tratamiento de un cáncer no hematopoyético en un individuo que tiene el cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende uno o más anticuerpos descritos en el presente documento, en el que el uno o más anticuerpos se unen a las células cancerosas del individuo. En algunas realizaciones, el cáncer no hematopoyético es cáncer colorrectal, pancreático, o gástrico. En algunas realizaciones, el anticuerpo está conjugado con una citotoxina.

65

La invención se refiere a un método para retrasar en un individuo el desarrollo de un cáncer no hematopoyético (tal como retrasar y/o inhibir la progresión de un cáncer) que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprenda uno o más anticuerpos descritos en el presente documento, en el que el uno o más anticuerpos se unen a las células cancerosas del individuo. El cáncer no hematopoyético puede ser cáncer colorrectal, pancreático o gástrico. El anticuerpo puede conjugarse con una citotoxina.

La invención también proporciona uno o más anticuerpos de la invención para su uso en un método para el tratamiento de un cáncer no hematopoyético en un individuo para su uso en combinación con una cantidad de uno o más anticuerpos descritos en el presente documento y una cantidad de otro agente anticanceroso, en el que el uno o más anticuerpos se unen a las células cancerosas del individuo, y por lo tanto el uno o más anticuerpos y el agente anticanceroso conjuntamente, proporcionan un tratamiento eficaz del cáncer en el individuo. En algunas realizaciones, el cáncer no hematopoyético es cáncer colorrectal, pancreático o gástrico. En algunas realizaciones, el agente anticanceroso es un agente quimioterapéutico.

Adicionalmente, la invención proporciona kits que comprenden una composición farmacéutica que contiene uno o más anticuerpos descritos en el presente documento. Adicionalmente los kits comprenden instrucciones para administrar a un individuo una cantidad eficaz de la composición farmacéutica para el tratamiento de un cáncer no hematopoyético. En algunas realizaciones, los kits comprenden instrucciones para administrar la composición farmacéutica junto con otro agente anticanceroso. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 11-30; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 10 y 31-37.

La invención también se refiere a kits que comprenden una primera composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento, comprendiendo una segunda composición farmacéutica otro agente anticanceroso e instrucciones para administrar conjuntamente a un individuo la primera composición farmacéutica y la segunda composición farmacéutica para el tratamiento de un cáncer no hematopoyético.

Debe entenderse que una, algunas o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención serán obvios para un experto en la materia.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una comparación y un alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre la región constante de cadena pesada de la IgG3 murina (SEC ID N°: 138) y la región constante de cadena pesada de la IgG1 humana (SEC ID N°: 139). La región bisagra se indica subrayada. Como se muestra en la Figura, la identidad de aminoácidos es de 214/333 (64,3 %), la similitud es de 261/333 (78,4 %), y los huecos son de 6/333 (1,8 %).

La Figura 2 (A-E) muestra una comparación y un alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre las regiones constantes de la IgG1 humana de cadena pesada no modificada y modificada y la Figura 2F muestra una comparación y un alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre las regiones constantes kappa de la IgG1 humana de cadena ligera no modificada y modificada.

La Figura 3 muestra la unión de los anticuerpos m5F1, c5F1v0, c5F1v15, y c5F1v16 con Colo205 a partir de análisis de citometría de flujo a diversas concentraciones que varían de 0,125 µg/ml a 4 µg/ml. Las señales de fondo (IFM) para los anticuerpos de control son: anticuerpo secundario anti-ratón: 3; anticuerpo secundario anti-ser humano: 3; y IgG de ratón: 4; IgG de ser humano: 5. Todos los anticuerpos, m5F1, c5F1v0, c5F1v15, y c5F1v16, muestran unión significativa con células Colo205 sobre las señales de fondo.

La Figura 4 (A y B) muestra una comparación y un alineamiento de secuencias de aminoácidos entre VH(a) y VL(b) de h5F1M, h5F1A Va, h5F1A Vs, h5F1M Va, y h5F1M Vs.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de, al menos, un sitio de reconocimiento antigénico, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término no solo incluye anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv monocatenario (ScFv, por las siglas del inglés *Single chain Fv*), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento antigénico. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM (o subclase de los mismos), y no es necesario que el

anticuerpo sea de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas del anticuerpo, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y diversas de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulina son muy conocidas.

Adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención pretende incluir moléculas biespecíficas, multiespecíficas, monocatenarias, quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido al que se le confiere al menos una región CDR del anticuerpo. Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos de dominio sencillo que son o el dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo o el dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo. Holt et al., (2003), Trends Biotechnol. 21:484-490. En la técnica también se conocen métodos para fabricar anticuerpos de dominio que comprenden o el dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo o el dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo, que contienen tres de las seis regiones determinantes de complementariedad de origen natural de un anticuerpo. Véase, por ejemplo, Muyldermans, Rev. Mol. Biotechnol. 74:277-302,2001.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades minoritarias. Generalmente los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se está obteniendo a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe considerarse como una producción que requiere del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, (1975), Nature, 256:495, o pueden fabricarse mediante métodos de ADN recombinante tal como se describe en la patente de Estados Unidos nº. 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de fagotecas generadas usando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty et al., (1990), Nature, 348:552-554.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que tiene una región variable o parte de una región variable de una primera especie y una región constante de una segunda especie. Un anticuerpo quimérico intacto comprende dos copias de una cadena ligera quimérica y dos copias de una cadena pesada quimérica. La producción de anticuerpos quiméricos es conocida en la técnica (Cabilly et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3273-3277; Harlow y Lane (1988), Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory). Normalmente, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable de las cadenas tanto ligera como pesada imita las regiones variables de los anticuerpos procedentes de una especie de mamíferos, mientras que las partes constantes son homólogas a las secuencias en los anticuerpos procedentes de otras. En algunas realizaciones, las modificaciones de aminoácidos pueden realizarse en la región variable y/o en la región constante.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a un material que tiene una pureza (es decir, está libre de contaminantes) de al menos 50 %, más preferentemente una pureza de al menos 90 %, más preferentemente una pureza del al menos 95 %, más preferentemente una pureza del al menos 98 %, más preferentemente una pureza del al menos 99 %.

Como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanizados" se refieren a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR, por "*Framework Región*") de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias marco conservadas, pero están incluidos para afinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, al anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos, o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Óptimamente el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región o dominio (Fc) constante de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos pueden tener regiones Fc modificadas como se describe en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "procedentes de" una o más CDR del anticuerpo original.

5 Como se usa en el presente documento "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha fabricado usando cualquiera de las técnicas de fabricación de anticuerpos humanos conocidas en la materia o desveladas en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humana o al menos un polipéptido de cadena ligera humana. Un ejemplo de este tipo es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena pesada humana y cadena ligera murina. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una fagoteca, en la que esa fagoteca expresa anticuerpos humanos (Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., (1998), PNAS, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., (1991), J. Mol. Biol., 222:581). También pueden fabricarse anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes endógenos de inmunoglobulina se han inactivado parcial o completamente. Esta estrategia se describe en las patentes de Estados Unidos nº. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016. Como alternativa, los anticuerpos humanos pueden prepararse inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (dichos linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., (1991), J. Immunol., 147 (1):86-95; y la patente de Estados Unidos nº. 5.750.373.

25 Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, en solitario como en combinación. Cada una de las regiones variables de la cadena pesada y ligera consiste en cuatro regiones marco conservadas (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. En cada cadena, las CDR se sujetan entre sí en estrecha proximidad mediante las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Hay al menos dos técnicas para determinar las CDR (1) una estrategia basada en la variabilidad de secuencias de especies cruzadas (es decir, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) una estrategia basada en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). Como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a las CDR definidas mediante cualquier estrategia o mediante una combinación de ambas estrategias.

35 Una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, en solitario o en combinación. Una región constante de un anticuerpo generalmente proporciona estabilidad estructural y otras funciones biológicas tales como asociación, secreción, movilidad transplacentaria y unión al complemento de la cadena de anticuerpo, pero no está implicada con la unión al antígeno. La secuencia de aminoácidos y correspondientes secuencias exónicas en los genes de la región constante dependerán de la especie de la cual proceden; sin embargo, variaciones en la secuencia de aminoácidos que conducen a alotipos estarán relativamente limitadas por regiones constantes particulares dentro de una especie. La región variable de cada cadena está unida con la región constante mediante una secuencia polipeptídica enlazadora. La secuencia enlazadora está codificada por una secuencia "J" en el gen de cadena ligera y por una combinación de una secuencia "D" y una secuencia "J" en el gen de cadena pesada.

50 Como se usa en el presente documento "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "CCDA" se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK, *Natural Killer*), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. La actividad CCDA de una molécula de interés puede evaluarse usando un ensayo de CCDA *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales NK. Como alternativa, o de manera adicional, la actividad CCDA de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.*, 1998, PNAS (USA), 95: 652-656.

60 La "citotoxicidad dependiente de complemento" y "CDC" se refiere a la lisis de una diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) formando complejo con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996).

65 Los términos "polipéptido", "oligopéptido" "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también incluyen un polímero de aminoácido que se ha modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo,

formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquiera otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, dado que los polipéptidos de la presente invención se basan en un anticuerpo, los polipéptidos pueden producirse como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

Un "polinucleótido" o un "ácido nucleico", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante la ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si estuviese presente, la modificación en la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes que no sean nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustituciones de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplos, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces con carga (por ejemplo, fosfortioatos, fosforditioatos, etc.), aquellas que contienen fracciones colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen queladores (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellas que contienen alquiladores, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido (o polinucleótidos). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo habitualmente presentes en los azúcares pueden reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse mediante grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos. El OH 5' y 3' terminal puede estar fosforilado o sustituirse con aminas o fracciones de grupos orgánicos de terminación de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse con grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metilo-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares  $\alpha$ -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos abásicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR<sub>2</sub> ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub> ("formacetal"), en la que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido, que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. En un polinucleótido no es necesario que todos los enlaces sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

Como se usa en el presente documento, "vector" significa una construcción, que puede administrarse, y que preferentemente expresa, uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Como ejemplos de vectores se incluyen, pero sin limitación, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmidos, cósmidos o de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

Como se usa en el presente documento, "secuencia de control de expresión" significa una secuencia de ácidos nucleicos que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de expresión está unida operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos a transcribir.

Como se usa en el presente documento, una "dosificación eficaz" o "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Para el uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como la eliminación o reducción del riesgo, la disminución de la gravedad o el retraso de la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios presentes durante el desarrollo de la enfermedad. Para el uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, el aumento de la calidad de vida de las personas que padecen la enfermedad, la disminución de la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, el efecto potenciador de otra medicación tal como mediante direccionamiento, retraso de la progresión de la enfermedad y/o la prolongación de la supervivencia. En el caso de cáncer o tumor, una cantidad eficaz del fármaco puede tener el efecto de reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor, inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir, es decir, ralentizar hasta cierto grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto grado, el crecimiento del tumor; y/o aliviar hasta

cierto grado uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Una dosificación eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de la presente invención, una dosificación eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para cumplir con el tratamiento profiláctico o terapéutico bien directamente o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto, o composición farmacéutica puede conseguirse o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, una “dosificación eficaz” puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y un solo agente puede considerarse que se proporciona en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes distintos, se consigue o puede conseguirse un resultado deseable.

Como se usa en el presente documento, “junto con” se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, “junto con” se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

Como se usa en el presente documento “tratamiento” o “tratar” es una estrategia para obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo y preferentemente resultados clínicos. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno de los siguientes: reducir la proliferación de (o destruir) células cancerosas, disminuir los síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de las personas que padecen la enfermedad, disminuir la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, retrasar el progreso de la enfermedad y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

Como se usa en el presente documento “retrasar el desarrollo de una enfermedad” significa aplazar, impedir, disminuir, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (tal como cáncer). Este retraso puede ser de diversas longitudes de tiempo, dependiendo del historial de la enfermedad y/o del individuo que vaya a tratarse. Como es obvio para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, incluir la prevención, ya que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, puede retrasarse un cáncer en estadio tardío, tal como el desarrollo de metástasis.

Un “individuo” o un “sujeto” es un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos también incluyen, pero sin limitación, animales de granja, animales para el deporte, mascotas (tales como gatos, perros, caballos), primates, ratones y ratas.

Como se usa en el presente documento, la expresión “reconoce específicamente” o “se une específicamente” se refiere interacciones medibles y reproducibles tales como atracción o unión entre una diana y un anticuerpo, que es determinativa de la presencia de la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas que incluye moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferencialmente a un epítipo es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidéz, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otros epítopos de la diana o epítopos no diana. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o fracción o epítipo) que se une específica o preferencialmente a una primera diana puede unirse o no específica o preferentemente a una segunda diana. Como tal, la “unión específica” o “unión preferencial” no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva. Un anticuerpo que se une específicamente a una diana puede tener una constante de asociación de al menos aproximadamente  $10^3 \text{ M}^{-1}$  o  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , algunas veces de aproximadamente  $10^5 \text{ M}^{-1}$  o  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , en otros casos de aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$  o  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$  a  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , o de aproximadamente  $10_{10} \text{ M}^{-1}$  a  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  o mayor. Para seleccionar anticuerpos inmunorreactivos selectivamente con una proteína particular pueden usarse diversos formatos de inmunoensayo. Por ejemplo, habitualmente se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar inmunoreactividad específica.

Como se usa en el presente documento, los términos “cáncer”, “tumor”, “canceroso” y “maligno” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, sin limitación, carcinoma, incluyendo adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma y sarcoma. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, glioma, cáncer de ovario, cáncer de hígado tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer tiroideo, cáncer testicular, cáncer esofágico y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “uno”, “una”, “el”, “la” y “lo” incluyen referencias en plural a menos que el contexto dictamine claramente lo contrario. Por ejemplo, una referencia a un “anticuerpo” es una referencia a de uno a muchos anticuerpos, tales como cantidades molares, e incluyen sus equivalentes conocidas por los expertos en la técnica y así sucesivamente.

Se entiende que los aspectos y las variaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen “que consiste” y/o “que consiste esencialmente” o aspectos y variaciones.

Anticuerpos y polipéptidos que se unen específicamente a un epítipo de carbohidrato en CD43 y ACE expresado en células cancerosas no hematopoyéticas

En el presente documento se describen anticuerpos aislados y polipéptidos derivados de los anticuerpos, que se unen específicamente a un epítipo en CD43 y/o ACE expresados por células cancerosas no hematopoyéticas, pero que no se unen específicamente a CD43 expresado por un leucocito (tal como una célula T periférica) o por una célula Jurkat.

En el presente documento se describe un anticuerpo que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una o más regiones CDR de la SEC ID N°: 1 y una región constante de cadena pesada de la IgG1 humana. El anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende una o más regiones CDR de la SEC ID N°: 2 y una región constante de cadena ligera kappa.

En algunos casos, se modifican (incluyendo inserción, delección y sustitución de aminoácidos) uno o más restos de aminoácidos en la región constante de cadena pesada y/o en la región constante de cadena ligera del anticuerpo. Por ejemplo, pueden modificarse los restos de aminoácidos como los que se muestran en los Ejemplos.

En el presente documento se describe un anticuerpo que comprende: (a) una región variable de cadena pesada que comprende una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 11-30; y (b) una región variable de cadena ligera que comprende una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 10 y 31-37. En algunos casos, la una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 son tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1. En algunos casos, la una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 son tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. En algunos casos, la CDR1, CDR2 y CDR3 en la cadena pesada comprenden las secuencias de aminoácidos de SYVMH (SEC ID N°: 168), YINPYNGGTQYNEKFKG (SEC ID N°: 169), y RTFPYYFDY (SEC ID N°: 170), respectivamente. En algunos casos, la CDR1, CDR2 y CDR3 en la cadena ligera comprenden las secuencias de aminoácidos de RSSQSILHSNGNTYLE (SEC ID N°: 171), KVSNRFS (SEC ID N°: 172); y FQGSHAPLT (SEC ID N°: 173), respectivamente. En algunos casos, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la SEC ID N°: 1 o 3. En algunos casos, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de la SEC ID N°: 2 o 4.

En algunos casos, la una o más CDR derivadas de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 y/o SEC ID N°: 2 son al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 % idénticas a al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis CDR de la SEC ID N°: 1 y/o SEC ID N°: 2.

Los anticuerpos y polipéptidos descritos en el presente documento pueden tener adicionalmente una o más de las siguientes características: (a) la unión del anticuerpo o del polipéptido con el epítipo se reduce si la molécula que comprende el epítipo se trata con  $\alpha$ -1  $\rightarrow$ (2,3,4)-Fucosidasa; (b) la unión del anticuerpo o del polipéptido con el epítipo se inhibe mediante un carbohidrato que comprende una estructura Le<sup>a</sup>, una estructura Le<sup>a</sup>-lactosa, una estructura LNDFH II y/o una estructura LNT; (c) se induce la muerte de la célula cancerosa no hematopoyética (tal como a través de apoptosis) después de unirse al epítipo expresado sobre la superficie celular de la célula cancerosa en ausencia de conjugación con citotoxina y función inmunoefectora; (d) se inhibe el crecimiento o la proliferación celular de la célula cancerosa no hematopoyética después de la unión con el epítipo expresado sobre la superficie celular de la célula cancerosa; y (e) se trata o previene en un individuo el cáncer no hematopoyético que expresa el epítipo sobre la superficie celular, tal como cáncer colorrectal y cáncer gástrico.

Como se usa en el presente documento, el término “inhibición” incluye inhibición parcial y completa. Por ejemplo, la unión del anticuerpo o polipéptido con el epítipo en CD43 y ACE está inhibida al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, o al menos aproximadamente 90 %, mediante un carbohidrato que comprende una estructura Le<sup>a</sup>, una estructura Le<sup>a</sup>-lactosa, una estructura LNDFH II, o una estructura LNT. La unión del anticuerpo con el epítipo puede inhibirse mediante competición directa o mediante otros mecanismos.

Los ejemplos de células cancerosas no hematopoyéticas que expresan el epítipo incluyen, pero sin limitación, células de cáncer colorrectal (tales como COLO 205 y DLD-1), células de cáncer gástrico (tales como NCI-N87), y células de cáncer pancreático (tales como SU.86.86, ATCC nº CRL-1837).

5 Los anticuerpos y polipéptidos descritos en el presente documento pueden reconocer un dominio extracelular de una CD43 presente en una célula cancerosa no hematopoyética, pero no se une a un dominio extracelular de una CD43 de leucocito (por ejemplo, una célula T periférica), o un dominio extracelular de CD43 expresado en una célula Jurkat (una célula de leucemia linfoblastoidea). En algunos casos, los nuevos anticuerpos o polipéptidos de la invención no se usen específicamente a CD43 expresada por una célula de origen hematopoyético.

10 La divulgación del presente documento incluye modificaciones en anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento, incluyendo, anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente a sus propiedades y variantes que tienen actividad y/o afinidad potenciada o disminuida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo puede mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada por la CD43 o ACE expresado por la célula cancerosa. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no requiere describirse con detalle en el presente documento. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservativas de restos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambian de manera significativa de un modo perjudicial la actividad funcional, o el uso de análogos químicos.

20 Las inserciones de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales oscilando en longitud de un resto a polipéptidos que contiene una centena o más restos, así como inserciones intrasecuencia de un único resto o múltiples restos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a una etiqueta epitópica. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

25 Las variantes de sustitución tienen al menos un resto de aminoácido retirado de la molécula de anticuerpo y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de la FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la siguiente tabla con el encabezado de "sustituciones conservativas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la siguiente tabla, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y los productos pueden explorarse.

35

Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos

Resto Original	Sustituciones Conservativas	Sustituciones Ejemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan seleccionando sustituciones que difieren significativamente en cuanto a su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) No polares: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polares sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Ácidos (cargados negativamente): Asp, Glu;
- (4) Básicos (cargados positivamente): Lys, Arg;
- (5) Restos que ejercen influencia sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

Las sustituciones no conservativas se realizan cambiando un miembro de una de estas clases por uno de otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la correcta conformación del anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula e impedir el cruzamiento aberrante. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv.

Las modificaciones de aminoácidos pueden variar de cambios o modificaciones de uno o más aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad y/o especificidad de unión. En algunas realizaciones, se realizan no más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de un dominio CDR. En otras realizaciones, se realizan no más de una a tres sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de un dominio CDR. En otras realizaciones más, el dominio CDR es CDRH3 y/o CDR L3.

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glucosilados y no glucosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones post-traduccionales, tales como, por ejemplo, glucosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos están glucosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, (1997), *Chem. Immunol.* 65: 111-128; Wright y Morrison, (1997), *TibTECH* 15: 26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd *et al.*, (1996), *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318; Wittwe y Howard, (1990), *Biochem.* 29: 4175-4180) y a la interacción intramolecular entre partes de la glucoproteína, que puede afectar a la conformación y presentar una superficie tridimensional de la glucoproteína (Hefferis y Lund, citado anteriormente; Wyss y Wagner, (1996), *Current Opin. Biotech.* 7: 409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glucoproteína determinada a determinadas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específico. También se ha informado que la glucosilación de los anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En particular, se informó que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc biseccionado, tenían actividad de CCDA mejorada (Umana *et al.*, (1999), *Mature Biotech.* 17: 176-180).

La glucosilación de anticuerpos está normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, en la que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxilo aminoácido, más normalmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación en el anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Los patrones de glucosilación de los anticuerpos también pueden alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glucosilación depende enormemente de la célula hospedadora usada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo de célula usado para la expresión de glucoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como posibles agentes terapéuticos, es raramente la célula nativa, pueden esperarse variaciones en el patrón de glucosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse *et al.*, (1997), *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070).

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden incluir fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, monocatenarios (ScFv), sus mutantes, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina

que comprenda un sitio de reconocimiento antigénico de la especificidad necesaria. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, de camélido, de ser humano o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos humanizados).

5 La afinidad de unión del polipéptido (incluyendo anticuerpo) con CD43 o con el ACE puede ser menor que cualquiera de aproximadamente 500 nM, aproximadamente 400 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM. Como bien se sabe en la técnica, la afinidad de unión puede expresarse como  $K_D$ , o constante de disociación, y un aumento de la afinidad de unión corresponde a una  $K_D$  disminuida. Una manera de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos con CD43 o  
10 con el ACE es midiendo la afinidad de unión de los fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede escindir-se con papaína o expresarse de manera recombinante. La afinidad de un fragmento Fab de un anticuerpo puede determinarse mediante resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (RPS) de BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ) y ELISA. Las constantes de asociación ( $k_{on}$ ) y de disociación ( $k_{off}$ ) cinética (generalmente medidas a  
15 25 °C) se obtienen; y los valores de la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) se calculan como  $k_{off}/k_{on}$ .

En algunos casos, los anticuerpos y polipéptidos reducen el número de células cancerosas y/o inhiben el crecimiento celular o la proliferación de las células tumorales o cancerosas que tienen el epítipo. Preferentemente, la reducción en el número de células o la inhibición del crecimiento o proliferación celular es de al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 75 % o mayor en comparación con la célula no tratada con el anticuerpo o polipéptidos. Las células cancerosas incluyen, pero sin limitación, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer pulmonar y cáncer gástrico.

25 En algunos casos, los anticuerpos y polipéptidos pueden inducir solo muerte celular, por ejemplo, a través de apoptosis, después de la unión del epítipo expresado en superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética. La expresión "inducir muerte celular" como se usa en el presente documento, significa que los anticuerpos o polipéptidos de la presente invención, pueden interaccionar directamente con una molécula expresada en la superficie celular, y solo la unión/interacción es suficiente para inducir la muerte celular en las células sin la  
30 ayuda de otros factores tales como conjugación de citotoxina u otras funciones inmunoefectoras, es decir, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) o fagocitosis.

Como se usa en el presente documento, el término "apoptosis" se refiere a un proceso dirigido por genes de destrucción celular intracelular. La apoptosis es distinta de la necrosis; ésta incluye interrupción citoesquelética, contracción y condensación citoplasmática, expresión de fosfatidilserina en la superficie externa de la membrana celular y ampollamiento, dando como resultado la formación de vesículas unidas a la membrana celular o cuerpos apoptóticos. El proceso también se denomina "muerte celular programada". Durante la apoptosis, se observan fenómenos característicos, tales como superficies celulares curvadas, condensación de la cromatina nuclear, fragmentación del ADN cromosómico y pérdida de función mitocondrial. Pueden usarse diversas tecnologías conocidas para detectar la apoptosis, tales como tinción de células con Anexina V, yoduro de propidio, ensayo de fragmentación de ADN y la tecnología YO-PRO-1 (Invitrogen).

Los métodos para detectar la muerte celular (tales como apoptosis) incluyen, pero sin limitación, detectar la morfología, la fragmentación de ADN, la actividad enzimática y la degradación de polipéptidos, etc. Véase Siman *et al.* Patente de Estados Unidos nº 6.048.703; Martin y Green (1995), *Cell*, 82: 349-52; Thomberry y Lazebnik (1998), *Science*, 281:1312-6; Zou *et al.*, Patente de Estados Unidos nº 6.291.643; Scovassi y Poirier (1999), *Mol. Cell Biochem.*, 199: 125-37; Wyllie *et al.* (1980), *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251-306; Belhocine *et al.* (2004), *Technol. Cancer Res. Treat.*, 3(1): 23-32.

50 En algunos casos, los anticuerpos y polipéptidos reconocen un epítipo de conformación expresado en una célula cancerosa no hematopoyética, y este epítipo incluye una estructura que tiene características físicas y químicas equivalentes a las de la estructura formada por el tripéptido, N'-Trp-Pro-Ile-C'. Como se usa en el presente documento, "un epítipo que incluye una estructura que tiene características físicas y químicas equivalentes a las de la estructura formada por un péptido" significa que ambas estructuras tienen una propiedad física y química similar relacionada con la unión del anticuerpo de tal manera que un anticuerpo que se une específicamente a una estructura se uniría a ambas estructuras. En algunos casos los anticuerpos y polipéptidos se unen a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos, N'-Trp-Pro-Ile-C' y en el extremo N del polipéptido.

60 En algunos casos los anticuerpos y polipéptidos compiten con el anticuerpo m5F1 o h5F1 por la unión con el epítipo expresado sobre la superficie celular de la célula cancerosa. En algunos casos, los anticuerpos o polipéptidos se unen a un epítipo sobre CD43 o ACE al cual se une al menos uno de los anticuerpos m5F1 o h5F1.

65 Para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo epítipo reconociendo epítopos idénticos o estéricamente solapantes o si un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de otro anticuerpo con el antígeno pueden usarse ensayos de competencia. Estos ensayos son conocidos en la técnica. Normalmente, el antígeno o las células que

expresan el antígeno se inmovilizan en una placa multipocillo y se mide la capacidad de los anticuerpos no marcados para bloquear la unión de los anticuerpos marcados. Los marcadores habituales para dichos ensayos de competencia son marcadores radioactivos o enzimáticos.

5 En algunas realizaciones, la CDR es una CDR de Kabat. En otras realizaciones, la CDR es una CDR de Chothia. En otras realizaciones, la CDR es una combinación de una CDR de Kabat y una Chothia (también denominada "CDR combinada" o "CDR ampliada"). En otras palabras, para cualquier realización determinada que contenga más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de Kabat, Chothia y/o combinada.

10 En la técnica se conocen métodos para fabricar anticuerpos y polipéptidos procedentes de los anticuerpos y se desvelan en el presente documento. Los anticuerpos generados pueden ensayarse por tener unión específica con el epítipo sobre CD-43 o ACE expresados por las células cancerosas o tumorales no hematopoyéticas, pero sin unión específica a leucocitos que expresen CD43, células Jurkat y/u otras células de origen hematopoyético que expresen CD43. Las células cancerosas o el dominio extracelular (incluyendo sus fragmentos) que contienen el epítipo  
15 pueden usarse para realizar ensayos.

La línea de células Jurkat es una línea celular de leucemia linfoblastoidea, y se estableció a partir de sangre periférica de un niño de 14 años por Schneider *et al.*, Int. J. Cancer 19: 621-626, 1977. En el comercio se dispone de diversas líneas de células Jurkat, por ejemplo, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (por ejemplo, ATCC TIB-  
20 152, ATCC TIB-153, ATCC CRL-2678).

La especificidad de unión de los anticuerpos producidos puede determinarse por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal  
25 puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard de Munson y Pollard (1980), *Anal. Biochem.*, 107: 220.

Los anticuerpos identificados pueden ensayarse adicionalmente con respecto a su capacidad para inducir la muerte celular (por ejemplo, apoptosis), y/o inhibir el crecimiento o la proliferación celular usando métodos conocidos en la  
30 técnica y descritos en el presente documento.

Los anticuerpos también pueden fabricarse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos nº 4.816.567 y 6.331.415. Por ejemplo, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención pueden aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales  
35 (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede disponerse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis  
40 de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos nº 4.816.567) o por unión covalente a la secuencia que codifica la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación antigénica de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

En algunos casos los anticuerpos se expresan a partir de dos vectores de expresión. El primer vector de expresión codifica una cadena pesada del anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humanizado), que comprende una primera  
50 parte que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo, y una segunda parte que codifica una región constante de la cadena pesada del anticuerpo. En algunos casos, la primera parte codifica una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº 1, y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nº: 11-30. En algunos casos, la una o  
55 más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 1 son tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 1. El segundo vector de expresión codifica una cadena ligera del anticuerpo, que comprende una primera parte que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo, y una segunda parte que codifica una región constante de la cadena ligera del anticuerpo. En algunos casos la primera parte codifica una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una o más regiones  
60 CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nº: 10 y 31-37. En algunos casos, la una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2 son tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2.

65 Como alternativa, los anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) se expresan de un solo vector de expresión. El único vector de expresión codifica tanto la cadena pesada como la cadena ligera de los anticuerpos de

la presente invención. En algunos casos, el vector de expresión comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 11-30, y una región variable de cadena ligera que comprende una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 10 y 31-37. En algunos casos, la una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 son tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1. En algunos casos, la una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 son tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

Normalmente el vector de expresión tiene secuencias transcripcionales y traduccionales reguladoras que proceden de especies compatibles con una célula hospedadora. Además, normalmente el vector lleva uno o más genes específicos que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas.

Se conoce una gran variedad de sistemas de expresión recombinante hospedador-vector para células eucariotas y pueden usarse en la invención. Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadero, es la más habitualmente usada entre los microorganismos eucariotas, aunque se dispone de diversas otras cepas, tales como *Pichia pastoris*. Las líneas celulares procedentes de organismos multicelulares tales como Sp2/0 u de Ovario de Hámster Chino (CHO), que están disponibles en la ATCC, también pueden usarse como hospedadoras. Los plásmidos de vectores típicos adecuados para transformaciones de células eucariotas son, por ejemplo, pSV2neo y pSV2gpt (ATCC), pSVL y pSVK3 (Pharmacia), y pBPV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.).

Las células hospedadoras eucariotas útiles en la presente invención son, preferentemente, células de hibridoma, mieloma, plasmacitoma o linfoma. Sin embargo, otras células hospedadoras eucariotas pueden utilizarse adecuadamente siempre que las células hospedadoras de mamíferos sean capaces de reconocer secuencias de ADN transcripcionales y traduccionales para la expresión de las proteínas; de procesar el péptido líder por escisión de la secuencia líder y secreción de las proteínas; y proporcionar modificaciones postraduccionales de las proteínas, por ejemplo, glucosilación.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona células hospedadoras eucariotas que se transforman mediante vectores de expresión recombinante que comprenden construcciones de ADN desveladas en el presente documento y que son capaces de expresar los anticuerpos o los polipéptidos de la presente invención. Por lo tanto, en algunos casos, las células hospedadoras transformadas de la invención, comprenden al menos una construcción de ADN que comprende las secuencias de ADN de cadena ligera y pesada descritas en el presente documento, y secuencias transcripcionales y traduccionales reguladoras que se posicionan en relación a las secuencias de ADN que codifican la cadena ligera y pesada para dirigir la expresión de anticuerpos o polipéptidos.

Las células hospedadoras usadas pueden transformarse de diversas maneras mediante procedimientos de transfección convencionales bien conocidos en la técnica. Entre los procedimientos de transfección convencionales que pueden usarse se encuentran las técnicas de electroporación, la fusión de protoplastos y las técnicas de precipitación con fosfato de calcio. Dichas técnicas se describen en líneas generales en F. Toneguzzo *et al.* (1986), *Mol. Cell. Biol.* 6: 703-706; G. Chu *et al.*, *Nucleic Acid Res.* (1987), 15: 1311-1325; D. Rice *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979), 79: 7862-7865; y V. Oi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983), 80: 825-829.

En caso de dos vectores de expresión, los dos vectores de expresión pueden transferirse al interior de una célula hospedadora uno a uno por separado o conjuntamente (co-transferencia o co-transfección).

La presente divulgación también proporciona un método para producir los anticuerpos o polipéptidos, que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de expresión que codifican los anticuerpos o los polipéptidos, y recuperar los anticuerpos o los polipéptidos del cultivo por medios bien conocidos por un experto de la técnica. En algunos casos los anticuerpos pueden aislarse o purificarse mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Además, los anticuerpos deseados pueden producirse en un animal transgénico. Un animal transgénico adecuado puede obtenerse de acuerdo con métodos convencionales que incluyen un microinyección en huevos de los vectores de expresión apropiados, transferencia de los huevos en hembras pseudo preñadas y seleccionar un descendiente que exprese el anticuerpo deseado.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos quiméricos que reconocen específicamente el epítipo en CD43 y ACE expresados por una célula cancerosa. Por ejemplo, las regiones variables y constantes del anticuerpo quimérico son de especies distintas. En algunos casos, las regiones variables de la cadena tanto ligera como pesada son de anticuerpos murinos descritos en el presente documento. En algunos casos, las regiones variables comprenden secuencias de aminoácidos de regiones variables de la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2 o los restos 20-137 de la SEC ID N°: 1 y los restos 20-131 de la SEC ID N°: 2. En algunos casos, las regiones constantes de la

cadena tanto pesada como ligera son de anticuerpos humanos.

El anticuerpo quimérico puede prepararse mediante técnicas bien establecidas en la materia. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos nº 6.808.901, 6.652.852, 6.329.508, 6.120.767 y 5.677.427. En general, el anticuerpo quimérico puede prepararse obteniendo los ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos, insertando los ADNc en un vector de expresión, que después de introducirse en células hospedadoras eucariotas, expresan el anticuerpo quimérico de la presente invención. Preferentemente, el vector expresión lleva una secuencia de cadena pesada o ligera constante funcionalmente completa de tal manera que cualquier secuencia de cadena pesada o ligera variable puede insertarse fácilmente en el vector de expresión.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo humanizado que reconoce específicamente el epítipo en CD43 y ACE expresado por una célula cancerosa no hematopoyética. El anticuerpo humanizado es normalmente un anticuerpo humano en el que los restos de las CDR se reemplazan por restos de las CDR de una especie no humana tal como un ratón, una rata o un conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada Fv del anticuerpo humano se reemplazan por restos no humanos correspondientes.

Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región marco conservada del anticuerpo usar durante el proceso de humanización (3) humanizar las metodologías/técnicas reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos nº 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; 6.180.370; y 6.548.640. Por ejemplo, la región constante puede modificarse por ingeniería genética para que se asemeje más a las regiones constantes humanas para impedir una respuesta inmunitaria si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y en tratamientos con seres humanos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos nº 5.997.867 y 5.866.692.

Es importante que los anticuerpos se humanicen conservando la afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas. Para conseguir este objetivo, pueden prepararse anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de secuencias parentales y humanizadas. Se dispone habitualmente de modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son conocidos por los expertos en la técnica. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite analizar la función probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que ejercen influencia sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse restos FR y combinarse a partir de la secuencia consenso e importarse de tal manera que se obtenga la característica del anticuerpo deseada, tal como la afinidad aumentada por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión antigénica. Los anticuerpos humanizados también pueden contener modificaciones en la región bisagra para mejorar una o más características del anticuerpo.

En otra alternativa, los anticuerpos pueden explorarse y fabricarse de manera recombinante mediante tecnología de presentación de fagos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos nº 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743 y 6.265.150; y Winter *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455 (1994). Como alternativa, la tecnología de presentación de fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios génicos de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V del anticuerpo se clonan en fase en cualquiera de un gen de proteína de recubrimiento mayoritaria o minoritaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Dado que las partículas filamentosas contienen una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe aquellas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación de fagos puede realizarse en diversos formatos; para una revisión, véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Pueden usarse diversas fuentes de segmentos del gen V para la presentación de fagos. Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) aislaron una diversa matriz de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria al azar de genes V procedentes de bazos de ratones inmunizados. Un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados puede construirse y pueden aislarse anticuerpos contra una diversa matriz de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Mark *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o por Griffith *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993). En una respuesta inmunitaria natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una alta tasa (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad, y las células B que presentan alta afinidad por inmunoglobulinas en la superficie se copian preferentemente y se diferencian durante exposiciones antigénicas posteriores. Este proceso natural puede imitarse empleando la técnica conocida como "barajado de cadenas". Marks, *et al.*, Bio/Technol. 10:779-783 (1992). En este método, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por presentación de fagos puede mejorarse reemplazando

secuencialmente los genes de la región V de cadena pesada y ligera con repertorios de variantes de origen natural (repertorios) de genes de dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de pM-nM. Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res. 21: 2265-2266 (1993) han descrito una estrategia para fabricar repertorios muy grandes de anticuerpos de fagos (también conocida como "la madre de todas las bibliotecas"). El barajado de genes también puede usarse para obtener anticuerpos humanos de anticuerpos de roedores, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo del roedor de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impronta epitópica", el gen de dominio V de cadena ligera o pesada de anticuerpos de roedores obtenidos por la técnica de presentación de fagos, se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humano, creando quimeras de roedor-humano. La selección sobre el antígeno da como resultado el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restablecer un sitio de unión antigénica funcional, es decir, el epítipo dirige (imprime) la elección del compañero. Cuando el proceso se repite para reemplazar el dominio V restante de roedor, se obtiene un anticuerpo humano (véase, la Publicación PCT n° WO 93/06213, publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedores mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos marco conservados o CDR de origen roedor. Es obvio que aunque el análisis anterior pertenece a anticuerpos humanizados, los principios generales analizados son aplicables a anticuerpos diseñados a medida para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos.

En determinados casos, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano. Los anticuerpos no humanos que se unen específicamente a un antígeno pueden usarse para producir un anticuerpo completamente humano que se une a ese antígeno. Por ejemplo, el experto en la técnica puede emplear una técnica de intercambio de cadenas, en la que la cadena pesada de un anticuerpo no humano se co-expresa con una biblioteca de expresión que expresa diferentes cadenas ligeras humanas. Los anticuerpos híbridos resultantes, que contienen una cadena ligera humana y una cadena pesada no humana, se exploran después con respecto a la unión antigénica. Las cadenas ligeras que participan en la unión antigénica se co-expresan después con una biblioteca de cadenas pesadas de anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos resultantes se exploran una vez más con respecto a la unión antigénica. Técnicas tales como ésta se describen adicionalmente en la Patente de Estados Unidos 5.565.332. Además, puede usarse un antígeno para inocular un animal que es transgénico para genes de inmunoglobulina humanos. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.661.016.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, usando las técnicas desveladas en el presente documento puede prepararse un anticuerpo monoclonal que tiene especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En la técnica se conocen métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, (1986), *Methods in Enzymology* 121: 210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos estaba basada en la co-expresión de dos pares de cadena ligera-pesada de inmunoglobulina teniendo con las dos cadenas pesadas diferentes especificidades (Millstein y Cuello, (1983), *Nature* 305, 537-539).

De acuerdo con una estrategia para preparar anticuerpos biespecíficos, los dominios variables de los anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, de la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos, y se co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando se usan proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas en la construcción para proporcionar los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en iguales proporciones da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular significado.

En una estrategia, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina únicamente en una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas. Esta estrategia se describe en la Publicación PCT n° WO 94/04690, publicada el 3 de marzo de 1994.

Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos por enlace covalente, también se encuentran dentro del ámbito de la invención. Dichos anticuerpos se han usado para dirigir células del sistema inmunitario contra células no deseadas (Patente de Estados Unidos n° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (Publicación PCT n° WO 91/00360 y WO 92/200373; y documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquiera de los métodos de entrecruzamiento convencionales. Los agentes y las técnicas de entrecruzamiento adecuados son muy conocidos en la materia y se describen en la Patente Estados Unidos n° 4.676.980.

También pueden producirse fragmentos FV monocatenarios, como se describe en Iliades *et al.*, 1997, FEBS Letters, 409: 437-441. El acoplamiento de dichos fragmentos monocatenarios usando diversos enlazadores se describe en Kortt *et al.*, 1997, Protein Engineering, 10: 423-433. En la materia se conoce bien varias técnicas para la producción recombinante y manipulación de anticuerpos.

5 La presente divulgación no solo incluye los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente, sino también cualquiera de sus fragmentos que contienen la región de unión activa de los anticuerpos, tales como fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv y similares. Dichos fragmentos pueden producirse a partir de anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento usando técnicas bien establecidas en la materia (Rousseaux *et al.* (1986), en  
10 Methods Enzymol., 121: 663-69 Academic Press).

En la materia se conocen bien métodos para preparar fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de 100 Kd denominado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y  
15 opcionalmente un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo dando como resultado la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes de Fab de 50 Kd. Como alternativa, una escisión enzimática usando papaína produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n° 4.036.945 y 4.331.647 y referencias incluidas en su interior. También, véase Nisonoff *et al.* (1960), Arch Biochem. Biophys. 89: 230; Porter (1959), Biochem. J. 73: 119,  
20 Edelman *et al.*, in METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, pág. 422 (Academic Press 1967).

Como alternativa, el fragmento Fab puede producirse insertando ADN que codifique Fab del anticuerpo en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas, introduciendo el vector en un procariota o eucariota para expresar el fragmento Fab.

25 Además de seleccionar células hospedadoras, los factores que afectan a la glucosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modos de crecimiento, formulación de medios, densidad del cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos métodos para alterar el patrón de glucosilación conseguido en un organismo hospedador particular incluyendo la introducción o sobre-expresión de  
30 determinadas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Patente de Estados Unidos N° 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glucosilación, o determinados tipos de glucosilación, pueden eliminarse enzimáticamente de la glucoproteína, por ejemplo usando endoglucosidasa H (Endo H), N-glucosidasa F, endoglucosidasa F1, endoglucosidasa F2, endoglucosidasa F3. Además, la célula hospedadora recombinante puede modificarse genéticamente para que sea defectuosa en el procesamiento de determinados tipos de polisacáridos. Estas técnicas  
35 y similares son muy conocidas en la materia.

El anticuerpo de la invención puede modificarse usando técnicas de acoplamiento conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Pueden usarse modificaciones,  
40 por ejemplo, para la unión de marcadores para inmunoensayos. Los polipéptidos modificados se preparan usando procedimientos establecidos en la técnica y pueden explorarse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación y en los Ejemplos.

El anticuerpo o polipéptido puede conjugarse (por ejemplo, ligarse) a un agente, tal como a un agente terapéutico y a un marcador. Son ejemplos de agentes terapéuticos las fracciones radioactivas, las citotoxinas, o las moléculas  
45 quimioterapéuticas.

El anticuerpo (o polipéptido) puede ligarse a un marcador tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva, una enzima, o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Como se usa en el presente documento, el término "marcador" se refiere a cualquier molécula que pueda detectarse. En un ejemplo determinado, un  
50 anticuerpo puede marcarse mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado. En un ejemplo determinado fracciones de biotina que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un identificador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorímetros) pueden unirse al anticuerpo. En determinados casos, puede incorporarse un marcador en el interior o unirse a otro reactivo que, a su vez, se une al anticuerpo de interés. Por ejemplo, un marcador puede incorporarse en o unirse a  
55 un anticuerpo que, a su vez, se une específicamente al anticuerpo de interés. En determinados casos, el identificador o marcador también puede ser terapéutico. En la técnica se conocen y pueden usarse diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glucoproteínas. Determinadas clases generales de marcadores incluyen, pero sin imitación, marcadores enzimáticos, fluorescentes, quimioluminiscentes y radioactivos. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, aunque sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (ITCF), rodamina, fósforos de lantánidos, ficoeritrina (FE), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano  
60 picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, penicilinas, luciferasa), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas). En algunas realizaciones, los marcadores se unen por brazos espaciadores de diversas longitudes para  
65

reducir el posible impedimento estérico.

La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento y un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen en la técnica, y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente efectiva. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales de diversa osmolaridad, agentes encapsulantes, tampones y potenciadores de penetración en la piel. En Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20<sup>a</sup> Ed, Mack Publishing (2000), se exponen excipientes, así como formulaciones para la administración parenteral y no parenteral de fármacos.

La divulgación proporciona composiciones (descritas en el presente documento) para su uso en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, tanto en el contexto de uso como un medicamento y/o como para su uso en la fabricación de un medicamento.

#### Polinucleótidos, vectores y células hospedadoras

La divulgación también proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los anticuerpos monoclonales y polipéptidos descritos en el presente documento. En algunos casos, los polipéptidos comprenden las secuencias de las regiones variables de cadena ligera y/o cadena pesada.

En algunos casos, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N<sup>o</sup>: 1 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N<sup>o</sup>: 11-30, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una o más regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N<sup>o</sup>: 2 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N<sup>o</sup>: 10 y 31-37. En algunos casos, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N<sup>o</sup>: 1 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N<sup>o</sup>: 11-30, y/o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las tres regiones CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N<sup>o</sup>: 2 y una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N<sup>o</sup>: 10 y 31-37.

Los expertos habituales en la técnica aprecian que, como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como el que se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos portan homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Por tanto, la presente invención contempla específicamente polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleótidas proporcionadas en el presente documento se encuentran dentro del ámbito de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden tener, aunque no necesariamente, una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

Los polinucleótidos pueden obtenerse usando síntesis química, métodos recombinantes o PCR. Los métodos de síntesis química de polinucleótidos son muy conocidos en la materia y no es preciso describirlos con detalle en el presente documento. Un experto en la técnica puede usar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos usando métodos recombinantes, un polinucleótido que comprende una secuencia deseada puede insertarse en un vector adecuado, y a su vez, el vector puede introducirse en una célula hospedadora adecuada para la replicación y amplificación, como se comenta más adelante en el presente documento. Los polinucleótidos pueden insertarse en células hospedadoras cualquiera de los medios conocidos en la técnica. Las células se transforman introduciendo un polinucleótido exógeno mediante captación directa, endocitosis, transfección, emparejamiento F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula hospedadora. El polinucleótido así amplificado puede aislarse de la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989).

Como alternativa, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología PCR es muy conocida en la técnica y se describe en las Patentes de Estados Unidos n<sup>o</sup> 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis *et al.* eds., Birkauswer Press, Boston (1994).

La divulgación también proporciona vectores (por ejemplo, vectores de clonación, vectores de expresión) que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos (incluyendo anticuerpos) descritos en el presente documento. Los vectores de clonación adecuados pueden construirse de acuerdo con técnicas convencionales, o pueden seleccionarse de una gran cantidad de vectores de clonación disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonación seleccionado pueda variar en función de la célula hospedadora que se desee usar, los vectores de clonación útiles generalmente tienen la capacidad de auto-replicarse, pueden poseer una sola diana para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden llevar genes para un marcador que pueda usarse en clones de selección que contengan el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, los ADN de fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Éstos y muchos otros vectores de clonación se encuentran disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Generalmente los vectores de expresión son construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. El vector de expresión puede ser replicable en las células hospedadoras bien como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y uno o más vectores de expresión desvelados en la publicación PCT n° WO 87/04462. Los componentes del vector pueden generalmente incluir, pero sin limitación, uno o más de lo siguiente: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control transcripcionales adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, traducción), también se requieren normalmente, uno o más elementos de control traduccionales, tales como sitios de unión a ribosoma, sitios de inicio de la traducción y codones de terminación.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula hospedadora mediante cualquiera de los diversos medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, en el que el vector es un agente infeccioso tal como un virus de la vacuna). La elección de introducir vectores o polinucleótidos a menudo dependerá de las características de la célula hospedadora.

La divulgación también proporciona células hospedadoras que comprenden cualquiera de los polinucleótidos o vectores descritos en el presente documento. Cualquiera de las células hospedadoras capaces de sobre-exresar los ADN heterólogos pueden usarse con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células hospedadoras de mamífero incluyen, pero sin limitación, células COS, HeLa y CHO. Véase también la Publicación PCT n° WO 87/04462. Las células hospedadoras adecuadas que no son de mamífero incluyen procariontas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*).

#### Usos diagnósticos

En el presente documento se desvela un método para usar los anticuerpos, polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención para la detección, diagnóstico y monitorización de una enfermedad, trastorno o afección asociadas con la expresión epitópica (bien aumentada o disminuida con respecto a una muestra normal, y/o una expresión inapropiada, tal como la presencia de expresión en uno o más tejidos y/o una o más células que normalmente carecen de la expresión epitópica).

En algunos casos, el método comprende detectar la expresión epitópica en una muestra obtenida de un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, tal como cáncer colorrectal, pancreático, gástrico y pulmonar. Preferentemente, el método de detección comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo, polipéptido o polinucleótido de la presente invención y determinar si el nivel de unión difiere del de una muestra de control o de comparación. El método es también útil para determinar si los anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento son un tratamiento apropiado para el paciente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una muestra" o "una muestra biológica" se refiere a organismo completo o a un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes (por ejemplo fluidos corporales, incluyendo pero sin limitación, sangre, mucosidad, fluido linfático, fluido sinovial, fluido cerebroespinal, saliva, fluido amniótico, sangre de cordón umbilical, orina, fluido vaginal y semen). "Una muestra" o "una muestra biológica" se refiere adicionalmente a un homogeneizado, lisado o extracto preparado a partir de un organismo completo o un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes, o de una fracción o una parte de los mismos, que incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, las secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores, órganos. Más frecuentemente, la muestra se ha extraído de un animal, aunque la expresión "una muestra" o "una muestra biológica" también pueda referirse a células o a tejidos analizados *in vivo*, es decir, sin extraer de un animal. Normalmente, "una muestra" o "una muestra biológica" contendrá células del animal, pero el término también puede referirse a material biológico no celular, tal como fracciones no celulares de sangre, saliva u orina, que pueden usarse para medir los niveles de polinucleótidos o polipéptidos asociados con cáncer. "Una muestra" o "una muestra biológica" adicionalmente se refiere a un medio, tal como un caldo nutriente o un gel en el que se ha propagado un

organismo, que contiene componentes celulares, tales como proteínas o moléculas de ácido nucleico.

En un ejemplo, las células o lisado de células/tejidos se ponen en contacto con un anticuerpo y se determina la unión entre el anticuerpo y la célula. Cuando las células de ensayo muestran actividad de unión en comparación con una  
5 célula de control del mismo tipo de tejido, esto puede indicar que la célula de ensayo es cancerosa. En algunas realizaciones, las células de ensayo son de tejidos humanos.

Para detectar la unión específica del antígeno con el anticuerpo pueden usarse diversos métodos conocidos en la técnica. Los inmunoensayos ejemplares que pueden realizarse de acuerdo con la invención incluyen inmunoensayo  
10 de polarización fluorescente (FPIA, por sus siglas en inglés *Fluorescence Polarization ImmunoAssay*), inmunoensayo fluorescente (FIA, por sus siglas en inglés *Fluorescence Immunoassay*), inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés *Enzyme Immunoassay*), inmunoensayo de inhibición nefelométrico (NIA, por sus siglas en inglés *Nephelometric Inhibition Immunoassay*), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) y radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés  
15 *Radioimmunoassay*). Una fracción indicadora, o grupo marcador, puede unirse a los anticuerpos sujeto y se selecciona para satisfacer las necesidades de los diversos usos del método que a menudo están dictaminados por la disponibilidad del equipo de ensayo y procedimientos de inmunoensayo compatibles. Los marcadores apropiados incluyen, sin limitación, radionúclidos (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$  o  $^{32}\text{P}$ ), enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, o  $\beta$ -galactosidasa), fracciones fluorescentes o proteínas (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, GFP o BFP), o fracciones luminiscentes (por ejemplo, nanopartículas Qdot™ proporcionadas por la Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA). Los expertos habituales en la materia conocen técnicas generales a usar en la realización de los diversos inmunoensayos indicados anteriormente.

Para los fines de diagnóstico, el polipéptido, incluyendo anticuerpos, puede marcarse con una fracción detectable  
25 que incluya, pero sin limitación, radioisótopos, marcadores fluorescentes y diversos marcadores de sustrato enzimáticos conocidos en la técnica. En la técnica se conocen métodos para de conjugación de marcadores con un anticuerpo.

En algunos casos, los polipéptidos, incluyendo anticuerpos, no requieren marcarse, y su presencia puede detectarse  
30 usando un anticuerpo marcado que se une a los anticuerpos.

Los anticuerpos pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos directos e indirectos de tipo sándwich y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).  
35

Los anticuerpos y polipéptidos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*, tales como formación de imágenes *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo o el polipéptido se marca con un radionúclido (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ , o  $^3\text{H}$ ) de tal manera que las células o los tejidos de interés pueden localizarse usando  
40 inmunoescintigrafía.

El anticuerpo también puede usarse como un reactivo de tinción en patología usando técnicas bien conocidas en la materia.

#### Usos terapéuticos

Los anticuerpos desvelados en el presente documento pueden inducir la muerte de células cancerosas no hematopoyéticas. Por tanto, en el presente documento se desvelan usos terapéuticos de los anticuerpos y polipéptidos en el tratamiento y/o retraso del desarrollo de cáncer, tal como, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular y cáncer tiroideo. Cualquier cáncer  
50 puede tratarse, tal como cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer pulmonar, cáncer de mama, tumor cerebral, melanoma maligno, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, linfomas, linfoma de células T, mieloma múltiple, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, carcinoma endometrial, cáncer de ovario, cáncer esofágico, cáncer de hígado, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer cutáneo, carcinoma de tracto urinario, cáncer de próstata, coriocarcinoma, cáncer faríngeo, cáncer laríngeo, tecomatosis, androblastoma, hiperplasia del endometrio, endometriosis, embrioma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, hemangioma, hemangioma cavernoso, angioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, neurofibroma, oligodendroglioma, meduloblastoma, ganglioneuroblastoma, glioma, rabdomyosarcoma, hamartoblastoma, sarcoma osteogénico, leiomyosarcoma, sarcoma tiroideo y tumor de Wilms, siempre que la célula cancerosa exprese el epítipo reconocido por los anticuerpos descritos en el presente documento. Adicionalmente el método puede comprender una etapa de  
55 detectar la unión entre un anticuerpo o un polipéptido descritos en el presente documento y una célula tumoral o cancerosa en un individuo a tratar.

Generalmente, a un sujeto que necesite el tratamiento se le administra una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo o un polipéptido, mediante lo cual se inhibe el crecimiento de la célula cancerosa y/o se induce la muerte de la célula cancerosa. Preferentemente, la composición se formula con un transportador farmacéuticamente aceptable.  
65

En un ejemplo la composición se formula para la administración mediante inyección intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, e intramuscular, y otras formas de administración tal como oral, mucosa, mediante inhalación, sublingual, etc.

- 5 En otro ejemplo la presente divulgación también contempla la administración de una composición que comprende los anticuerpos o polipéptidos de la presente invención conjugados con otras moléculas, tales como marcadores detectables o agentes terapéuticos o citotóxicos. Los agentes pueden incluir, pero sin limitación, radioisótopos, toxinas, toxoides, agentes inflamatorios, enzimas, moléculas antisentido, péptidos, citocinas o agentes quimioterapéuticos. Los métodos para conjugar los anticuerpos con dichas moléculas son muy conocidos en general por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 10 89/12624; la Patente de Estados Unidos nº 5.314.995; y el documento EP 396.387.

En un ejemplo, la composición comprende un anticuerpo o un polipéptido conjugado con un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos pueden incluir cualquier agente que sea perjudicial para las células. Una clase preferida de agentes citotóxicos que puede conjugarse con los anticuerpos o fragmentos puede incluir, pero sin limitación 15 paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

20 La dosificación necesaria para el tratamiento depende de la elección de la vía de administración, de la naturaleza de la formulación, de la naturaleza de la dolencia del sujeto, de las dimensiones del sujeto, del peso, del área superficial, de la edad y del sexo; de otros fármacos que se estén administrando y del criterio del médico tratante. Las dosificaciones adecuadas se encuentran en el intervalo de 0,01-1000,0 mg/kg.

25 Generalmente, puede usarse cualquiera de las siguientes dosis: se administra una dosis de al menos aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 750 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal; al menos 30 aproximadamente 250 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, o menor. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis semanal de 35 aproximadamente 6 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles, dependiendo del patrón de descomposición farmacocinética que espera obtener el médico. Las consideraciones empíricas, tales como la semivida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

40 En algunos sujetos, puede precisarse más de una dosis. La frecuencia de la administración puede determinarse y ajustarse durante el ciclo de la terapia. Por ejemplo, la frecuencia de la administración puede determinarse o ajustándose basándose en el tipo y en el estadio del cáncer a tratar, de si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente y de la respuesta contra el agente, y del criterio del médico tratante. Normalmente el médico administrará un anticuerpo terapéutico (tal como un 45 anticuerpo 5F1 quimérico) hasta que se consiga una dosificación apropiada para obtener el resultado deseado. En algunos casos, pueden ser apropiadas formulaciones de anticuerpos de liberación continua sostenida. En la técnica se conocen diversas formulaciones y dispositivos para conseguir la liberación sostenida.

En un ejemplo, pueden determinarse empíricamente dosificaciones de los anticuerpos o polipéptidos en sujetos a los 50 cuales se les ha proporcionado una o más administraciones. Los sujetos reciben dosis en aumento de los anticuerpos o polipéptidos. Para evaluar la eficacia de los anticuerpos o polipéptidos, pueden monitorizarse marcadores de los síntomas de la enfermedad tales como CD43 o ACE. La eficacia *in vivo* también puede medirse evaluando la carga o el volumen tumoral, el tiempo de progresión de la enfermedad (TPE) y/o determinando las tasas de respuesta (TR).

55 La administración de un anticuerpo o polipéptido de acuerdo con el método de la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la afección fisiológica del receptor, de si el propósito de la administración si es terapéutico o profiláctico y de otros factores conocidos por los médicos expertos. La administración de un anticuerpo o un polipéptido puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo 60 preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciada.

Otras formulaciones incluyen formas de administración idóneas conocidas en la técnica que incluyen, pero sin limitación, transportadores tales como liposomas. Véase, por ejemplo, Mahato *et al.* (1997) Pharm. Res. 14: 853-859. Las preparaciones liposomales incluyen, pero sin limitación, citofectinas, vesículas multilamlares y vesículas 65 unilamlares.

En otro ejemplo, la composición puede comprender uno o más agentes anticancerosos, uno o más anticuerpos descritos en el presente documento, o un anticuerpo o polipéptido que se una a un antígeno diferente. Dicha composición puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco anticuerpos diferentes. Los anticuerpos y otros agentes anticancerosos pueden estar en la misma formulación (por ejemplo, en una mezcla, como a menudo se indica en la técnica), o en formulaciones distintas pero administradas simultánea o secuencialmente, y son particularmente útiles en el tratamiento de una amplia diversidad de poblaciones de individuos.

Un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento también puede usarse para la administración y expresión de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la presente invención en la célula deseada. Resulta obvio que un vector de expresión pueda usarse para dirigir la expresión del anticuerpo o polipéptido. El vector de expresión puede administrarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal, dérmica, sublingual o por inhalación. Por ejemplo, la administración de los vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, bombardeo de partículas o administración por catéter, y administración tópica. Un experto en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos nº 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471.

También puede usarse la administración dirigida de las composiciones terapéuticas que comprenden un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos de la presente invención. Las técnicas de administración de ADN mediada por receptores se describen, por ejemplo, en Findeis *et al.*, Trends Biotechnol. (1993) 11: 202; Chiou *et al.*, Gene Therapeutics: Methods and Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994); Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1988) 263: 621; Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1994) 269: 542; Zenke *et al.* (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3655; Wu *et al.* (1991), J. Biol. Chem. 266: 338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. Durante un protocolo de terapia génica también pueden usarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg, y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN.

Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden administrarse usando vehículos de administración de genes. Los vehículos de administración de genes pueden ser de origen viral o no viral (véase, en líneas generales, Jolly (1994), Cancer Gene Therapy 1: 51; Kimura (1994), Human Gene Therapy 5: 845; Connelly (1985), Human Gene Therapy 1: 185; y Kaplitt (1994), Nature Genetics 6: 148). La expresión de dichas secuencias codificantes puede inducirse usando promotores heterólogos o endógenos de mamífero. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o puede estar regulada.

En la técnica se conocen vectores basados en virus para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada. Los vehículos ejemplares basados en virus incluyen, pero sin limitación, retrovirus recombinantes, por ejemplo, Publicación PCT nº WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; Patentes de Estados Unidos nº 5.219.740; 4.777.127; Patente de GB nº 2,200,651; y la Patente EP nº 0 345 242; vectores basados en alfavirus, por ejemplo, vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del Río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532), y vectores de virus adenoasociados (VAA), por ejemplo Publicación PCT Nº. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655. También puede emplearse la administración de ADN ligado a adenovirus destruidos como se describe en Curiel (1992), Hum. Gene Ther. 3: 147.

Los vehículos y métodos de administración no viral también pueden emplearse, incluyendo, pero sin limitación, ADN policatiónico condensado ligado o no ligado a adenovirus destruidos solos (véase, por ejemplo, Curiel (1992), Hum. Gene Ther. 3: 147); ADN ligado a ligando (véase, por ejemplo, Wu (1989), J. Biol. Chem. 264: 16985); células de vehículo de administración de células eucariotas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 5.814.482; las Publicaciones PCT nº WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización de carga de ácidos nucleicos o fusión con membranas celulares.

También puede emplearse ADN desnudo. En la Publicación PCT nº WO 90/11092 y en la Patente Estados Unidos nº 5.580.859 se describen métodos ejemplares de introducción de ADN desnudo. Los liposomas que pueden actuar sobre vehículos de administración de genes se describen en la Patente de Estados Unidos nº 5.422.120; en la Publicación PCT nº WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y en Patente EP Nº 0524 968. En Philip (1994), Mol. Cell Biol. 14: 2411 y en Woffendin (1994), PNAS 91: 1581 se describen estrategias adicionales.

Adicionalmente, la divulgación proporciona un método de tratamiento de cáncer en un individuo que comprende a) administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención y b) aplicar una segunda terapia contra el cáncer al individuo. En algunos casos, la segunda terapia incluye cirugía, radiación, terapia hormonal, terapia génica, otra terapia con anticuerpos y quimioterapia. La

composición que comprende el anticuerpo y la segunda terapia pueden aplicarse simultáneamente (por ejemplo, administración simultánea) y/o de manera secuencial (por ejemplo, administración secuencial). Por ejemplo, la composición que comprende el anticuerpo y la segunda terapia se aplica con un tiempo de separación de no más de aproximadamente 15 minutos, tal como de no más de aproximadamente cualquiera de 10, 5 o 1 minuto. Como alternativa, la composición que comprende el anticuerpo y la segunda terapia se aplica con un tiempo de separación de más de aproximadamente 15 minutos, tal como de aproximadamente cualquiera de 20, 30, 40, 50 o 60 minutos, 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas o 1 mes o más.

La composición que comprende un anticuerpo puede administrarse de manera secuencial o simultánea con uno o más agentes terapéuticos distintos tales como agentes quimioterapéuticos (tales como 5-FU, 5-FU/MTX, 5-FU/Leucovorina, Levamisol, Irinotecán, Oxaliplatino, Capecitabina o Uracilo/Tegafur), inmunoadyuvantes, agentes inhibidores de crecimiento, agentes citotóxicos y citocinas, etc. Las cantidades del anticuerpo y del agente terapéutico dependen del tipo de fármacos que se estén usando, de la afección patológica que vaya a tratarse y de la pauta y vías de administración pero generalmente serán menores de como si usasen individualmente.

Después de administración de la composición que comprende el anticuerpo descrito en el presente documento, la eficacia de la composición puede evaluarse tanto *in vitro* como *in vivo* mediante diversos métodos bien conocidos por un experto habitual en la técnica. Diversos modelos animales son muy conocidos para ensayar la actividad anticancerosa de una composición candidata. Éstos incluyen xenoinjerto tumoral humano en ratones desnudos atímicos o ratones scid/scid, o modelos tumorales murinos genéticos tales como ratones p53 genosuprimidos. La naturaleza *in vivo* de estos modelos animales los hace particularmente predictivos de respuestas en pacientes humanos. Dichos modelos pueden generarse introduciendo células en ratones singénicos, usando técnicas convencionales, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implantación de bazo, implantación intraperitoneal e implantación debajo de la cápsula renal, etc.

#### Kits

La divulgación también proporciona kits para su uso en los métodos de la presente invención. Los kits incluyen uno o más envases que comprenden un anticuerpo o un polipéptido purificado descrito en el presente documento e instrucciones para su uso de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento. En algunos casos, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del anticuerpo para tratar y/o retrasar el desarrollo de un cáncer no hematopoyético, tal como cáncer colorrectal, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. El kit puede comprender adicionalmente una descripción de la selección de un individuo idóneo para el tratamiento basándose en la identificación de si ese individuo tiene la enfermedad y el estadio de la enfermedad, o de si el epítipo se expresa en las células cancerosas del individuo.

En algunos casos, los kits para detectar una célula cancerosa en una muestra comprenden un anticuerpo o un polipéptido descrito en el presente documento y reactivos para detectar la unión del anticuerpo o del polipéptido a una célula en la muestra.

Las instrucciones relacionadas con el uso de los anticuerpos o polipéptidos para tratar o retrasar el desarrollo del cáncer generalmente incluyen información tal como dosificación, pauta de dosificación y vía de administración para el tratamiento que se desea. Los envases pueden ser dosis unitarias, paquetes voluminosos (por ejemplo, paquetes multidosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones proporcionadas en los kits de la invención son normalmente instrucciones escritas en una etiqueta o en un prospecto (por ejemplo, una lámina de papel incluida en el kit), aunque también pueden aceptarse instrucciones legibles por ordenador (por ejemplo, instrucciones sobre un disco de almacenamiento magnético u óptico).

La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para el tratamiento de un cáncer descrito en el presente documento. Pueden proporcionarse instrucciones para llevar a la práctica cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Los kits están en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, pero sin limitación, viales, frascos, tarros, envases flexibles (por ejemplo, bolsas Mylar o de plástico selladas), y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser cualquier bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo descrito en el presente documento. El recipiente puede comprender adicionalmente un segundo agente farmacéuticamente activo.

Opcionalmente, los kits pueden proporcionar componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o uno o más prospectos en o asociados

con en el recipiente.

**Ejemplos**

5 Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención pero sin limitarla.

**Ejemplo 1: Clonación de las Regiones Variables de las Cadenas Ligera y Pesada de 5F1**

10 Como se muestra en la Solicitud de Estados Unidos nº 11/811.303 presentada el 06/07/07 (publicada como Pub. U.S. nº 2008/0171043), los ADNc de región variable de las regiones variables de cadena ligera y pesada de 5F1 se amplificaron por PCR, y los ADNc sintetizados se subclonaron en pCRII (Invitrogen) para la determinación de la secuencia. Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron de diversos clones independientes y se analizaron. Se seleccionaron idénticas secuencias de ADNc de clones independientes para representar la región V de cadena ligera o pesada de cada anticuerpo. La Tabla 2 indicada a continuación muestra las secuencias de aminoácidos traducidas y las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones V de cadena ligera y pesada del anticuerpo 5F1 murino (m5F1) y del anticuerpo 5F1Vc humanizado (h5F1Vc).

20 Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de anticuerpos, y secuencias de ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de anticuerpo (las CDR se subrayan; las secuencias de péptido señal están en cursiva)

**secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 1) y secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 5) de la cadena pesada de m5F1**

1 M E W S W I F L F L L S G T A G V H S E  
 1 ATGGAATGGAGTTGGATATTTCTCTTTCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCACTCTGAG

21 V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V R M S  
 61 GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGGATGTCC

41 C T A S G Y T F T S Y V M H W I K Q K P  
 121 TGCACGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTATGCACTGGATAAAGCAGAAGCCT

61 G Q G L D W I G Y I N P Y N G G T Q Y N  
 181 GGGCAGGGCCTTGACTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGGTGGTACTCAGTACAAT

81 E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y M  
 241 GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG

101 E L S S L T S E D S A V Y Y C A R R T F  
 301 GAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACCGGACCTTC

121 P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S  
 361 CCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

25 **secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 2) y secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 6) de la cadena ligera de m5E1**

1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D  
 1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGAT

21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I  
 61 GTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATC

41 S C R S S Q S I L H S N G N T Y L E W Y  
 121 TCTTGACAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAAATGGTAC

61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S

30

181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT

81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S  
 241 GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC

101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H A P L  
 301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTACTACTGCTTTCAAGGTTTCACATGCTCCTCTC

121 T F G A G T K L E L K  
 361 ACGTTCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 3) y secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 7) de la cadena pesada de h5F1Vc.

1 M G W S W I F L F L L S G T A G V H S Q  
 1 ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCTGTCAGGTACCGGGCGTGCCTCTCAG

21 V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S  
 61 GTCCAGCTTGTCCAGTCTGGGGCTGAAGTCAAGAAACCTGGCTCGAGCGTGAAGGTCTCC

41 C K A S G Y T F T S Y V M H W V R Q A P  
 121 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTATGTTATGCACTGGGTAAGGCAGGCCCT

61 G Q G L E W I G Y I N P Y N G G T Q Y N  
 181 GGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGGTGGTACTCAGTACAAT

81 E K F K G K A T I T A D E S T N T A Y M  
 241 GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACAATTACTGCAGACGAATCCACCAATACAGCCTACATG

101 E L S S L T S E D S A V Y Y C A R R T F  
 301 GAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACAGCGCAGTCTATTACTGTGCAAGACCGGACCTTC

121 P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S  
 361 CCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCACGCTCACAGTCTCCTCA

5 secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 4) y secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº: 8) de la cadena ligera de h5F1Vc.

1 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G  
 1 ATGGAGACCGATACCTCCTGCTATGGGTCTCTGCTATGGGTCCCAGGATCAACCGGA

21 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T  
 61 GATATTCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTCTCTGCTAGCGTCGGGGATAGGGTCACC

41 I T C R S S Q S I L H S N G N T Y L E W  
 121 ATAACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG

61 Y Q Q K P G K A P K L L I Y K V S N R F  
 181 TACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCTCCCAAGCTTCTAATCTATAAAGTTTCCAACCGATTT

81 S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I  
 241 TCTGGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCGATTTACCCTCACAATC

101 S S L Q P D D F A T Y Y C F Q G S H A P  
 301 AGCTCTCTGCAGCCAGATGATTTGCCACTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACATGCTCCT

121 L T F G Q G T K V E L K  
 361 CTCACGTTTCGGTTCAGGGACCAAGGTGGAGCTGAAA

**Ejemplo 2. Versión modificada de variantes 5F1 quiméricas**

El isotipo del anticuerpo 5F1 murino es la IgG3 murina. Para obviar el problema de la respuesta a anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) y tener funciones dependientes de Fc más eficientes en seres humanos, se generó una forma quimérica del anticuerpo 5F1 (c5F1) (c5F1-v0; para la cadena pesada: SEC ID N° 1(VH), NO 9(CH); para la cadena ligera SEC ID N° 2(VL), NO 10(CL), véase Tabla 2 y la Figura 2) combinando la región variable (V) del anticuerpo 5F1 murino con la región constante de la IgG1 humana. También se compararon las secuencias de aminoácidos de la región constante de cadena pesada, que incluyen los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 de la IgG1 humana y la IgG3 murina. A partir de la comparación de secuencias, la región bisagra CH1 muestra la mayor diferencia entre la IgG3 murina y la IgG1 humana (Figura 1). Como se usa en el presente documento para las comparaciones de secuencia, “\*” significa que los restos en esa columna son idénticos en todas las secuencias en el alineamiento, “.” significa que se han observado sustituciones conservadas y “.” significa que se observan sustituciones semi-conservadas. Para tener el c5F1 con actividad inductora de apoptosis equivalente a la del 5F1 murina, se realizaron diversas modificaciones en los dominios CH1 y/o bisagra de la cadena pesada de c5F1 (Tabla 3; la numeración de restos en la Tabla 3 es conforme al sistema de numeración de EU como se describe en Burton, Mol. Immunol. 22: 161-206, 1985) y se realizaron diversas modificaciones en la cadena ligera de C5F1 (Tabla 4). En algunos casos, la cadena pesada modificada se expresó junto con una cadena ligera modificada c-terminal (Tabla 5). Véase también la Figura 2 para las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera.

20 Tabla 3: Modificación de la cadena pesada v0[H] basada en la región constante de IgG1 humana.

Versión	Modificación de CH1	Cebador de mutación	Cebador de amp.	Modificación de la bisagra	Cebador de mutación	Cebador de amp.
v1	S131C	M23,M24	A3, A4	C220S	M2	
v2	<sup>131</sup> SSK → CSR	M25,M26				
v3	<sup>129</sup> APSSKS (SEC ID N°: 140) → VPGCSD (SEC ID N°: 141)	M21,M22				
v4	<sup>131</sup> SSKS (SEC ID N°: 142) → GCSD (SEC ID N°: 143)	M19,M20				
v5	S131C	M23,M24	A3, A4	C220S, C226G	M2, M7, M8	A1,A2
v6	<sup>131</sup> SSK → CSR	M25,M26				
v7	S131C	M23,M24	A3, A4	C220S, <sup>226</sup> CPP → GSS	M2, M9, M10	
v8	<sup>131</sup> SSK → CSR	M25,M26				
v9	S131C	M23,M24	A3, A4	C220S, <sup>224</sup> HTCPP (SEC ID N°: 144) → PPGSS (SEC ID N°: 145)	M2, M11, M12	
v10	<sup>131</sup> SSK → CSR	M25,M26				
v11	<sup>129</sup> APSSKS (SEC ID N°: 146) → VPGCSD (SEC ID N°: 147)	M21,M22				
v12	<sup>131</sup> SSKS (SEC ID N°: 148) → GCSD (SEC ID N°: 149)	M19,M20				
v13	S131C	M23,M24	A3, A4	<sup>218</sup> KSCDKTHTCP P (SEC ID N°: 150) → RIPKPSTPPGSS (SEC ID N°: 151) (Reemplazar por bisagra de mIgG3)	M13, M14	
v14	<sup>131</sup> SSK → CSR	M25,M26				
v15				delecionar 220C(SD)	M1	
v16				C220S (SSD)	M2	
v17				<sup>218</sup> KSCDK (SEC ID N°: 152) → KSSCDK (SEC ID N°: 153)	M15, M16	A1,A2
v18				<sup>218</sup> KSSCDK (SEC ID N°: 154) → KCSDK (SEC ID N°: 155)	M17, M18	
v19				<sup>218</sup> KSKSCDK (SEC ID N°: 156) → KSDKSCDK (SEC ID N°: 157)	M3, M4	
v20				<sup>218</sup> KSCDK (SEC ID N°: 158) → KSCDKSDK (SEC ID N°: 159)	M5, M6	

Tabla 4: Modificaciones de la región constante de cadena ligera v0[L] basadas en la cadena kappa de la IgG1 humana

Versión	LC: modificación kappa	Cebador de mutación	Cebador de amp.
v0[L]	PVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 160)	A5, A6	
v21	PVTKSFNRGE <u>G</u> EC (SEC ID N°: 161)	M35, M36	
v22	PVTKSFNR <u>G</u> <u>G</u> EC (SEC ID N°: 162)	M37, M38	
v23	PVTKSFNR <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> EC (SEC ID N°: 163)	M39, M40	
v24	PVTKSFNR <u>G</u> <u>G</u> EC (SEC ID N°: 164)	M33, M34	
v25	PVTKSFNR <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> EC (SEC ID N°: 165)	M31, M32	
v26	PVTKSFNR <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> EC (SEC ID N°: 166)	M29, M30	
v27	PVTKSFNR <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> EC (SEC ID N°: 167)	M27, M28	

Tabla 5: Anticuerpos quiméricos que comprenden la combinación de las regiones constantes de cadena pesada y/o ligera modificadas

5

Anticuerpos	Cadena Pesada	Cadena Ligera
c5F1-v0	v0[H]	v0[L]
c5F1-v1	v1	v0[L]
c5F1-v2	v2	v0[L]
c5F1-v3	v3	v0[L]
c5F1-v4	v4	v0[L]
c5F1-v5	v5	v0[L]
c5F1-v6	v6	v0[L]
c5F1-v7	v7	v0[L]
c5F1-v8	v8	v0[L]
c5F1-v9	v9	v0[L]
c5F1-v10	v10	v0[L]
c5F1-v11	v11	v0[L]
c5F1-v12	v12	v0[L]
c5F1-v13	v13	v0[L]
c5F1-v14	v14	v0[L]
c5F1-v15	v15	v0[L]
c5F1-v16	v16	v0[L]
c5F1-v17	v17	v0[L]
c5F1-v18	v18	v0[L]
c5F1-v19	v19	v0[L]
c5F1-v20	v20	v0[L]
c5F1-v21	v19	v21
c5F1-v22	v19	v22
c5F1-v23	v19	v23
c5F1-v24	v19	v24
c5F1-v25	v19	v25
c5F1-v26	v19	v26
c5F1-v27	v19	v27

**Ejemplo 3. Introducción de cambios en las regiones constantes de cadena pesada y ligera del anticuerpo 5F1 quimérico**

- 10 Para facilitar la producción y purificación de anticuerpos, se usó 4pcDNA5-FRT-hlgG1 (generado en AbGenomics) que contiene las regiones constantes de la cadena pesada de IgG1 humana y la cadena ligera kappa, para expresar el 5F1 (c5F1). Las regiones variables de los genes de cadena pesada y de cadena ligera de m5F1 se amplificaron por separado por PCR usando los pares de cebadores de m5F1HC-XbaI f/m5F1HC-XbaI r y m5F1LC-XbaI f/m5F1LC-XbaI r (Tabla 6, cebadores A3/A7 y A8/ A9), respectivamente. Los productos de la PCR se digirieron con XbaI y se insertaron secuencialmente en pcDNA5-FRT-hlgG1. El plásmido de expresión c5F1 completamente
- 15

ensamblado c5F1/pcDNA5-FRT-hlgG1, que contenía tanto el gen de cadena pesada como el gen de cadena ligera de c5F1, se usó para expresar el anticuerpo c5F1 no modificado. También se usó el mismo plásmido como molde para la introducción de la modificación de c5F1.

5 Se usó mutagénesis dirigida a sitio basada en PCR con cebadores (Tabla 6) que introducen mutaciones en los genes de c5F1/pcDNA5-FRT-hlgG1 para generar las construcciones con delección (v15) o sustitución S (v16) en el resto 220 (numeración de Eu), usando el Kit de Mutagénesis Dirigida a Multisitio de QuikChange (Stratagene, Cat nº 200531-5) siguiendo las instrucciones del fabricante. El oligonucleótido M1(5'-CAGAGCCCAAATCTGACAAAACCTCACAC-3' (SEC ID Nº: 47)) se usó para deleccionar Cys en el resto 220 (v25), y el oligonucleótido M2 (5'-CAGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACAC-3' (SEC ID Nº: 48)) se usó para fabricar la sustitución de Ser en el resto 220 (v16). Para obviar la posibilidad de mutaciones al azar introducidas por PCR durante la mutagénesis dirigida a sitio, los fragmentos de ADN que contenían la modificación se escindieron con Agel (en la región CH1) y XmaI (en la región CH3) y se re-clonaron en el c5F1/pcDNA5-FRT-hlgG1 original, para reemplazar las regiones originales no modificadas.

15 Como alternativa, también se usó PCR solapante para generar todas las modificaciones restantes (Tabla 3-6). En resumen, se usaron dos reacciones PCR para generar dos fragmentos de productos de ADN que contenían las mutaciones deseadas, y que compartían una secuencia solapante de al menos 20 nucleótidos. Después, los dos productos de la PCR se mezclaron, se desnaturalizaron y se dejaron hibridar. Después se usó otra reacción PCR con los dos cebadores externos (de la dos PCR anteriores) para amplificar el fragmento de ADN ensamblado de longitud completa. Por ejemplo, para v1, se usaron los pares de cebadores A4/M23 y M24/A3 (Tabla 6) para generar los dos primeros fragmentos por PCR. Después los dos fragmentos de la PCR se mezclaron, se re-hibridaron, y se usaron los cebadores externos (A3 y A4) para generar el producto PCR de longitud completa. Finalmente, los fragmentos de ADN que contenían la modificación se re-clonaron en el c5F1/pcDNA5-FRT-hlgG1 original. El fragmento que contenía la modificación CH1 se re-clonó mediante XbaI (dentro del inicio de la región V de la cadena pesada) y los sitios Agel (dentro de la región CH1). El fragmento que contenía la modificación Bisagra se re-clonó mediante los sitios Agel (dentro de la región CH1) y XmaI (dentro de la región CH3). Para preparar la modificación c-terminal de la cadena ligera, los productos PCR se clonaron mediante los sitios AvrII (dentro del extremo de la región V de cadena ligera) y BamHI (dentro de la cadena aguas abajo de la secuencia codificante de la cadena ligera), para reemplazar las secuencias originales no modificadas.

Los plásmidos con o sin modificación se transfectaron después en células Flp-In-CHO (Invitrogen, Cat. nº R758-07) con lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat. nº 11668-019). El medio de cultivo que contenía los anticuerpos c5F1 modificados o no modificados se recogió, y el anticuerpo se purificó con Proteína A. El anticuerpo purificado se ensayó con respecto a la unión y a la actividad inductora de apoptosis en células COLO205.

#### Ensayo de unión

Los anticuerpos m5F1, c5F1-v0, c5F1-v15 y c5F1-v16 purificados a una concentración que variaba de 0,125 a 4 µg/ml, se añadieron a 1,5x10<sup>5</sup> células COLO 205 y se incubaron durante 30 min. a 4 °C, se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 2 % y NaN<sub>3</sub> al 0,05 %, seguido de incubación con 1 µg/ml de anticuerpos secundarios correspondientes (F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG (H+L) de ratón de cabra conjugado con R-PE, Southern Biotech, Cat. nº 1032-09; o anti-IgG humano de cabra conjugado con R-PE, Southern Biotech, Cat. nº 2040-09) a 4 °C durante 30 min. Al final de la tinción, las muestras se lavaron dos veces que contenía FBS al 2 % y NaN<sub>3</sub> al 0,05 % y se analizaron mediante un citómetro de flujo. Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo de BD-LSR (Becton Dickinson) usando el programa informático Cell Quest.

#### Ensayo de apoptosis

50 Se sembraron 1,5x10<sup>5</sup> de células COLO 205 en pocillos de placas de 96 pocillos. En un medio de cultivo se prepararon alícuotas recientes de anticuerpos m5F1, c5F1-v0, c5F1-v15, c5F1-v16 purificados y control a una concentración que variaba de 2 a 32 µg/ml y se añadieron a cada pocillo. Las muestras tratadas con m9E10 y h16C11A se usaron como control de isotipo. Las células tratadas se mantuvieron a 37 °C en una incubadora durante 6 h antes de realizar análisis FACS para apoptosis. Para el ensayo de apoptosis celular, la tinción con Anexina V se midió usando el Kit de Detección de Apoptosis Anexina-V-FITC (Strong Biotech, Cat. nº AVK250) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las células tratadas se recogieron y se resuspendieron en tampón de unión de Anexina V que contenía Anexina V-FITC a temperatura ambiente. Después de 15 min de incubación en la oscuridad, las células se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de unión de Anexina V. Antes de realizar el análisis FACS, se añadieron 0,25 µg/ml de yoduro de propidio (YP). Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo BD-LSR (Becton Dickinson) usando el programa informático Cell Quest. Las células positivas a Anexina VI y/o positivas a YP se consideraron células apoptóticas.

Tabla 6: Cebadores usados para introducir mutaciones en el gen c5F1

NOMBRE DE CEBADOR	SECUENCIA CEBADORA (5' → 3')	SEC ID Nº
(A1)hlgG1 CH1 f	ACCACCTCTCTTGCAGCCTC	SEC ID Nº: 38
(A2)hlgG1 CH3 r	CATTGCTCTCCCACTCCA	SEC ID Nº: 39
(A3)m5F1HC-XbaI f	TCTATCTAGATGGAATGGAGTTGGATATTTCTCTTTC	SEC ID Nº: 40
(A4)hlgG1 intrón r	ATATGGCTCTTGGCAGGTCT	SEC ID Nº: 41
(A5)pcDNA5FRT-hG1LC 3' BamHI/BglII-r	GGGAGATCTGGATCCTAGAAG	SEC ID Nº: 42
(A6)m5F1 LC AvrII-f	TAATCCTAGGAATTCTAAACTCTG	SEC ID Nº: 43
(A7)m5F1HC-XbaI r	ACCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC	SEC ID Nº: 44
(A8)m5F1LC-XbaI f	TCTATCTAGATGAAGTTGCCTGTTAGGCTG	SEC ID Nº: 45
(A9)m5F1LC-XbaI r	ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTTACGTTCAGCTCCAGC	SEC ID Nº: 46
(M1)hlgG1 bisagra d220C-f (v15)	CAGAGCCCAAATCTGACAAAACCTCACAC	SEC ID Nº: 47
(M2)hlgG1 bisagra C220S-f (v16)	CAGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACAC	SEC ID Nº: 48
(M3)hlgG1 bisagra KSD f(v19)	GAGCCCAAATCTGACAAATCTTGTGACAAAACTCACAC	SEC ID Nº: 49
(M4)hlgG1 bisagra KSD r(v19)	GATTTGTCAGATTTGGGCTCTGCAGAGAGAA GATTGG	SEC ID Nº: 50
(M5)hlgG1 bisagra SDK f (v20)	TGTGACAAATCTGACAAAACCTCACACATGCC CACCGTGCC	SEC ID Nº: 51
(M6)hlgG1 bisagra SDK r (v20)	GTTTTGTCAGATTTGTCACAAGATTTGGGCTC TGCAGAGAG	SEC ID Nº: 52
(M7)hlgG1 bisagra C226G f	AACTCACACAGGTCCACCGTGCCAGGTAAG CCAGCCCAG	SEC ID Nº: 53
(M8)hlgG1 bisagra C226G r	CACGGTGGACCTGTGTGAGTTTTGTCAGAAG ATTTGGGCT	SEC ID Nº: 54
(M9)hlgG1 bisagra 226CPP→GSS f	CACACAGGTTCTTCATGCCCAGGTAAGCCAG CCCAGGCC	SEC ID Nº: 55
(M10)hlgG1 bisagra 226CPP→GSS r	GGGCATGAAGAACCTGTGTGAGTTTTGTCAG AAGATTTGG	SEC ID Nº: 56
(M11)hlgG1 bisagra 224HTCPP→PPGSS f	CTCCCCCAGGTTCTTCATGCCCAGGTAAGCC AGCCCAGGC	SEC ID Nº: 57
(M12)hlgG1 bisagra 224HTCPP→PPGSS r	GCATGAAGAACCTGGGGGAGTTTTGTCAGAA GATTTGGGC	SEC ID Nº: 58
(M13)hlgG1 bisagra mlgG3 r(218KSCDKTHTCPP→RIPK PSTPPGSS)	CTGGGGGGGTACTGGGCTTGGGTATTCTGGG CTCTGCAGAGAGAAGATT	SEC ID Nº: 59
(M14)hlgG1 bisagra mlgG3 f(218KSCDKTHTCPP→RIPK STPPGSS)	CAAGCCCAGTACCCCCCAGGTTCTTCATGC CCAGGTAAGCCAGCCCAG	SEC ID Nº: 60
(M15)hlgG1 bisagra 218KSCDK→KSSCDK f (v17)	AGCCCAAATCTTCTTGTGACAAAACCTCACAC	SEC ID Nº: 61
(M16)hlgG1 bisagra 218KSCDK→KSSCDK r (v17)	GTCACAAGAAGATTTGGGCTCTGCAGAGAGA A	SEC ID Nº: 62
(M17)hlgG1 bisagra 218KSCDK→KCSKD f(v18)	GCCCAAATGTTCTGACAAAACCTCACACATGC CC	SEC ID Nº: 63
(M18)hlgG1 bisagra 218KSCDK→KCSKD r(v18)	TTTTGTCAGAACATTTGGGCTCTGCAGAGAG AA	SEC ID Nº: 64
(M19)hlgG1 CH1(131SSKS→GCSD)r	AGGTGTCAGTGCAGCCGGGTGCCAGGGGGA AGACCGAT	SEC ID Nº: 65

(M20)hlgG1 CH1(131SSKS→GCSD)f	ACCCGGCTGCAGTGACACCTCTGGGGGCACA GCGGCC	SEC ID Nº: 66
(M21)hlgG1 CH1(129APSSKS→ VPGCSD)r	TGTCACTGCAGCCGGGGACCAGGGGGAAGA CCGATGGGC	SEC ID Nº: 67
(M22)hlgG1 CH1(129APSSKS→ VPGCSD)f	GGTCCCCGGCTGCAGTGACACCTCTGGGGGC ACAGCGGC	SEC ID Nº: 68
(M23)hlgG1 CH1 S131C f	CCTGGCACCCCTGCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACA	SEC ID Nº: 69
(M24)hlgG1 CH1 S131C r	AGGTGCTCTTGGAGCAGGGTGCCAGGGGGA AGACCGAT	SEC ID Nº: 70
(M25)hlgG1 CH1131SSK→CSR f	CCTGGCACCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGG GGCACAGCG	SEC ID Nº: 71
(M26)hlgG1 CH1131SSK→CSR r	CAGAGGTGCTCCTGGAGCAGGGTGCCAGGG GGAAGACCGA	SEC ID Nº: 72
(M27)LC_GGGG-r	CACTCTCCACCACCTCCTCCCCTGTTGAAGCT CTTG	SEC ID Nº: 73
(M28)LC_GGGG-f	GGGGAGGAGGTGGTGGAGAGTGTTAGAGGG AGAAGTG	SEC ID Nº: 74
(M29)LC_GGG-r	ACACTCTCCACCTCCTCCCCTGTTGAAGCTCT TTG	SEC ID Nº: 75
(M30)LC_GGG-f	AGGGGAGGAGGTGGAGAGTGTTAGAGGGAG AAGTG	SEC ID Nº: 76
(M31)LC_GG-r	AACACTCTCCTCCTCCCCTGTTGAAGCTCTTT G	SEC ID Nº: 77
(M32)LC_GG-f	CAGGGGAGGAGGAGAGTGTTAGAGGGAGAA GTG	SEC ID Nº: 78
(M33)LC_G-r	AACACTCTCCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTG	SEC ID Nº: 79
(M34)LC_G-f	CAGGGGAGGAGAGTGTTAGAGGGAGAAGTG	SEC ID Nº: 80
(M35)LC_GE-r	AACACTCTCCTCCTCCCCTGTTGAAGCTCTTT G	SEC ID Nº: 81
(M36)LC_GE-f	CAGGGGAGAGGGAGAGTGTTAGAGGGAGAA GTG	SEC ID Nº: 82
(M37)LC_GGE-r	CACTCTCCCTCACCTCCCCTGTTGAAGCTCTT TGIG	SEC ID Nº: 83
(M38)LC_GGE-f	CAGGGGAGGTGAGGGAGAGTGTTAGAGGGGA GAAG	SEC ID Nº: 84
(M39)LC_GGGE-r	CACTCTCCCTCACCTCCCCTGTTGAAGCT CTTTGTG	SEC ID Nº: 85
(M40)LC_GGGE-f	CAGGGGAGGTGGTGGAGGGAGAGTGTTAGAG GGAGAAG	SEC ID Nº: 86

**RESULTADOS**

5 La unión y los efectores inductores de apoptosis de los anticuerpos 5F1 variantes de los análisis de citometría de flujo se muestran en la Fig. 3 y en la Tabla 7 más adelante. c5F1-v0, c5F1-v15 y c5F1-v16 se unen a células COLO 205 e inducen la apoptosis en células COLO 205, tal como su homólogo de ratón m5F1. c5F1-v15 y c5F1-v16 se unen a células COLO205 relativamente menos en comparación con c5F1. Para la inducción de la apoptosis, el efecto observado en las células tratadas con c5F1-v0 no era tan eficiente como con m5F1. Sin embargo, cuando se usaron las formas modificadas de la bisagra (c5F1-v15 y c5F1-v16), la actividad de inducción de la apoptosis se reestableció. Los dos c5F1-v15 y c5F1-v16 indujeron la apoptosis en células COLO205 de manera casi tan eficaz como m5F1, a pesar de que la actividad de unión de c5F1-v15 y c5F1-v16 con células COLO 205 parecía ser inferior que la de c5F1-v0. Los anticuerpos de control isotipo 9E10 (control IgG de ratón) y h16C11A (control Ig de ser humano) a 32 µg/ml no indujo la apoptosis en células COLO 205.

15

Tabla 7: Ensayo de apoptosis de seis horas por anticuerpos 5F1 en COLO 205

(µg/ml)	2	4	8	16	32
m5F1	35	53	76	92	93
c5F1	v0	33	46	68	78
c5F1	v15	64	82	93	96
c5F1	v16	58	78	92	96
m9E10					23
h16C11A					25
( % de células positivas a Anexina V y/o a YP)					

#### Ejemplo 4. Humanización de anticuerpos 5F1

- 5 También se desarrolló la versión humanizada de 5F1 (FIG. 4) y se incorporó en los plásmidos de expresión con modificaciones en la región constante (véanse los Ejemplos 2 y 3).

Se usó injertación de la región determinante de complementariedad (CDR) para generar la región variable de 5F1 humanizado (h5F1M), en la que, mediante tecnología de ADN recombinante, se incorporaron las CDR de la región variable 5F1 de ratón en una región marco conservada de una región variable de IgG1 humana (el anticuerpo aceptor). Para determinar el anticuerpo aceptor que mejor se ajusta al 5F1 murino, las secuencias de la región variable del 5F1 murino se analizaron junto con la base de datos de inmunoglobulinas generada en AbGenomics. El anticuerpo murino M195 (Man Sung Co *et al.* J. Immunol. 148(4): 1149-1154 (15 de febrero de 1992)) mostró ajustarse mejor al 5F1 murino. El anticuerpo humano Eu (Man Sung Co *et al.* J. Immunol. 148(4): 1149-1154 (15 de febrero de 1992)) se seleccionó en consecuencia como el anticuerpo aceptor. Se diseñaron secuencias de nucleótidos y se sintetizaron para generar una versión de 5F1 humanizada con las tres regiones CDR del 5F1 murino incorporadas en la región marco conservada de las regiones variables del anticuerpo Eu.

Para diseñar cada gen V de h5F1M, se sintetizaron cuatro pares de oligonucleótidos de 55-70 bases de longitud, que secuencialmente comparten regiones solapantes de al menos 18 nucleótidos (Tabla 8. Para la cadena pesada: H1-H8, para la cadena ligera: L1-L8). El ensamblaje y la amplificación de todos los genes V se realizaron en cuatro etapas: 1) los cuatro pares de oligonucleótidos complementarios (para la cadena pesada: H1/H2, H3/H4, H5/H6 y H7/H8; para la cadena ligera: L1/2, L3/L4, L5/L6 y L7/L8) se hibridaron y las regiones hueco en 3' se rellenaron con el fragmento Klenow en reacciones distintas para generar cuatro fragmentos de ADN bicatenarios (ADNbc); 2) los cuatro fragmentos de ADNbc resultantes se mezclaron por pares, se desnaturalizaron, se re-hibridaron y los huecos en 3' se rellenaron en dos reacciones distintas para generar dos fragmentos de ADNbc; 3) los dos fragmentos de ADNbc resultantes se mezclaron, se desnaturalizaron, se re-hibridaron y los huecos en 3' se rellenaron para crear el ADNbc de longitud completa; y 4) después se usó la reacción PCR con dos cebadores externos (para la cadena pesada: A10 y A11, para la cadena ligera: A12 y A13 (Tabla 8), que contenían el sitio XbaI, para amplificar los fragmentos VL y VH ensamblados.

Los fragmentos VH y VL que contenían XbaI se insertaron después en el vector pcDNA5-FRT-hlgG1 mediante el sitio NheI y el sitio AvrII para la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente. La expresión del plásmido h5F1M/pcDNA5-FRT-hlgG1 de h5F1M completamente ensamblado, que contenía tanto el gen de cadena pesada como de cadena ligera de h5F1M, se usó para expresar el anticuerpo h5F1M no modificado. También se usó el mismo plásmido como molde para la introducción de modificaciones en h5F1M (FIG. 4).

#### La modificación de h5F1-M

40 Para modificar la región variable de h5F1-M (FIG. 4) se usó PCR solapante y mutagénesis dirigida a sitio basada en PCR usando los cebadores indicados en las Tablas 8 y 9. Las regiones variables de h5F1, modificadas o no modificadas, se incorporaron en la región constante de la IgG humana (no modificada o modificada) como se ha mencionado en el Ejemplo 2-3. Los plásmidos de expresión se transfectaron después en células CHO. Los sobrenadantes se recogieron y los anticuerpos se purificaron con proteína A. Los anticuerpos purificados se ensayaron con respecto a la unión y función inductora de apoptosis en células COLO205.

Tabla 8: Listado de cebadores usados en el diseño de variantes de anticuerpos 5F1 humanizados.

NOMBRE DEL CEBADOR	SECUENCIA CEBADORA (5' → 3')	SEC ID Nº
(A10)5F1MH-A (65 meros)	TCTATCTAGATGGGATGGAGCTGGATCTTTCT CTTCCCTCCTGTCAGGTACCGCGGGCGTGCACT C	SEC ID Nº: 97
(A11)5F1MH-B (56 meros)	ACCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGG AGACTGTGACCAGGGTTCCTTGGC	SEC ID Nº: 98

(H1)5F1MH-1f (69 meros)	GTCAGGTACCGCGGGCGTGCACCTCTCAGGTCC AGCTTGTCCAGTCTGGGGCTGAAGTCAAGAAA CCTGG	SEC ID Nº: 99
(H2)5F1MH-2r (66 meros)	AGTAAAGGTGTAGCCAGAAGCCTTGCAGGAG ACCTTCACGCTCGAGCCAGGTTTCTTGA CTTC AGC	SEC ID Nº: 100
(H3)5F1MH-3f (67 meros)	GCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTATGTTATG CACTGGGTAAGGCAGGCCCTGGACAGGGTCT GG	SEC ID Nº: 101
(H4)5F1MH-4r (66 meros)	TTGTA CTGAGTACCACCATTGTAAGGATTAAT ATATCCAATCCATTCCAGACCCTGTCCAGGGG CC	SEC ID Nº: 102
(H5)5F1MH-5f (62 meros)	ATGGTGGTACTCAGTACAATGAGAAGTTCAAAA GGCAAGGCCACAATTACTGCAGACGAATCC	SEC ID Nº: 103
(H6)5F1MH-6r (63 meros)	CCTCAGATCTCAGGCTGCTCAGTTCCATGTAG GCTGTATTGGTGGATTCTGTCAGTAATTG	SEC ID Nº: 104
(H7)5F1MH-7f (64 meros)	GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCCGAGTCT ATTACTGTGCAAGACGGACCTTCCCCTACTAC	SEC ID Nº: 105
(H8)5F1MH-8r (60 meros)	TGAGGAGACTGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCC AGTAGTCAAAGTAGTACGGGAAGGTCCG	SEC ID Nº: 106
(A12)5F1ML-A (59 meros)	TCTATCTAGATGGAGACCGATACCCTCCTGCT ATGGGTCCCTCCTGCTATGGGTCCCAGG	SEC ID Nº: 107
(A13)5F1ML-B (58 meros)	ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTTACGTT TCAGCTCCACCTTGGTCCCCTGACCG	SEC ID Nº: 108
(L1)5F1ML-1f (62 meros)	TCCTGCTATGGGTCCCAGGATCAACCGGAGAT ATTCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTC	SEC ID Nº: 109
(L2)5F1ML-2r (60 meros)	GATCTGCAGGTTATGGTGACCCTATCCCCGAC GCTAGCAGAGAGGGGAAGATGGGAGACTGG	SEC ID Nº: 110
(L3)5F1ML-3f (64 meros)	CACCATAACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATT TACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG	SEC ID Nº: 111
(L4)5F1ML-4r (60 meros)	GATTAGAAGCTTGGGAGCTTTGCCTGGCTTCT GCTGGTACCATTCTAAATAGGTGTTTCC	SEC ID Nº: 112
(L5)5F1ML-5f (66 meros)	GCTCCCAAGCTTCTAATCTATAAAGTTCCAA CCGATTTTCTGGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGG C	SEC ID Nº: 113
(L6)5F1ML-6r (61 meros)	GCAGAGAGCTGATTGTGAGGGTGAAATCGGT CCCAGATCCACTGCCACTGAAGCGTGAAGG	SEC ID Nº: 114
(L7)5F1ML-7f (56 meros)	CTCACAATCAGCTCTCTGCAGCCAGATGATT CGCCACTTATTACTGCTTCAAGG	SEC ID Nº: 115
(L8)5F1ML-8r (63 meros)	CCACCTTGGTCCCCTGACCGAACGTGAGAGGA GCATGTGAACCTTGAAAGCAGTAATAAGTGG	SEC ID Nº: 116
(A14)h5F1AL C-B r(58 meros)	ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACCTTACGTT TGATCTCCACCTTGGTCCCCTGACCG	SEC ID Nº: 117
(M41)h5F1A/ M/D HCR106T, T110S f	GCAGCCTGACATCTGAGGACAGCGC	SEC ID Nº: 118
(M42)h5F1A/ M/D HCR106T, T110S r	GACTGCGCTGTCCTCAGATGTCAGGCTGCTCA GTTCCATG	SEC ID Nº: 119
(M43)h5F1M HC E93T-r	TTGGTGGATGTGTCTGCAGTAATTGTGGCCT	SEC ID Nº: 120
(M44)h5F1M HC E93T-f	ACTGCAGACACATCCACCAATACAGCCTACA	SEC ID Nº: 121
(M45)h5F1M LC Fw3-r	TCCCAGATCCTCAGCCTCCACTCTGCTGATCTT GAGGGTGAAATCGGTCCCA	SEC ID Nº: 122
(M46)h5F1M LC Fw3-f	AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGA ACTTATTA CTGCTTTC AAGG	SEC ID Nº: 123
(M47)h5F1A-HC A95S-f	GACACATCCTCCAGTACAGCCTACATGGAA	SEC ID Nº: 124
(M48)h5F1A-HC A95S-r	GCTGTACTGGAGGATGTGTCTGAAGTAATTG	SEC ID Nº: 125
(M49)h5F1A LC Fw3-r	TCCCAGATCTTCAGCCTCCACTCTGCTGATCTT GAGGGTGAAATCGGTCCCAGATC	SEC ID Nº: 126

(M50)h5F1A LC Fw3-f	AGAGTGGAGGCTGAAGATCTGGGAACTTATTA CTGCTTTCAAGG	SEC ID Nº: 127
(M51)h5F1A HC-S35A f	GTCAAGAAACCTGGCGCGAGCGTGAAGGTC	SEC ID Nº: 128
(M52)h5F1A HC-K86R, A87V f	CAAAGGCAGGGTCACAATTACTGCAGACGAA TC	SEC ID Nº: 129
(M53)h5F1A HC-K86R, A87V r	TAATTGTGACCCTGCCTTTGAACTTCTCATTG	SEC ID Nº: 130
(M54)h5F1A HC-A91S, E93T, T95A, N96S f	TTCAGACACATCCGCCAGTACAGCCTACATGG AACTGAG	SEC ID Nº: 131
(M55)h5F1A HC-A91S, E93T, T95A, N96S r	TACTGGCGGATGTGTCTGAAGTAATTGTGACC CTGCCTTTG	SEC ID Nº: 132
(M56)h5F1A HC-G63R, I67M f	AGCGTCTGGAATGGATGGGATATATTAATCCT TACAA	SEC ID Nº: 133
(M57)h5F1A HC-G63R, I67M r	TCCCATCCATTCCAGACGCTGTCCAGGGGCCT GCCTTA	SEC ID Nº: 134
(M58)h5F1A LC-L98F f	GGACCGATTTACCTTCACAATCAGCTCTC	SEC ID Nº: 135
(M5f)h5F1A LC-D106E, F107I f	CAGCCAGAAGATATCGCCACTTATTACTGCTT T	SEC ID Nº: 136
(M60)h5F1A LC-D106E, F107I r	GTGGCGATATCTTCTGGCTGCAGAGAGCTGAT	SEC ID Nº: 137

Tabla 9: Cebadores para modificar h5F1M

	VH		VL	
	Cebador de mutación	Cebador de amplificación	Cebador de mutación	Cebador de amplificación
h5F1M Va	M41/M42	A10/A11	--	--
h5F1M Vs	M41/M42, M43/M44	A10/A11	M45/M46	A12/A13
h5F1A Va	M41/M42, M51, M52/M53, M54/M55, M56/M 57,	A10/A11	M58, M59/M60	A12/A14
h5F1A Vs	M51, M52/M53, M54/M55, M56/M57, M41/M42, M47/M48	A10/A11	M58, M59/M60, M49/M50	A12/A14

**Ejemplo 5. Caracterización de variantes 5F1 químicas**

5

Unión de anticuerpos a células Colo205

Los anticuerpos m5F1, c5F1-v0, c5F1-v17, c5F1-v24 y c5F1-v25 purificados a una concentración de 1 µg/ml se añadieron a 2x10<sup>5</sup> células Colo205 y se incubaron durante 30 min a 4 °C, se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 1 %, seguido de incubación con 1 µg/ml de anticuerpos secundarios correspondientes (F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG (H+L) de ratón de cabra conjugado con R-PE, Southern Biotech, Cat. nº 1032-09; o anti-IgG humano de cabra conjugado con R-PE, Southern Biotech, Cat. nº 2040-09) a 4 °C durante 30 min. Al final de la tinción, las muestras se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 2 % y NaN<sub>3</sub> al 0,05 % y se analizaron mediante un citómetro de flujo. Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo de BD-LSR (Becton Dickinson) usando el programa informático Cell Quest.

10

15

Tabla 10. Unión a células Colo205

Anticuerpos	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)
mIgG3	7
m5F1	800
hIgG1	6
c5F1v0	2760
c5F1v17	2303
c5F1v24	3134
c5F1v25	3174

Ensayo de apoptosis

Se sembraron  $1,5 \times 10^5$  células Colo205 en pocillos de placas de 96 pocillos. En un medio de cultivo, se prepararon alícuotas recientes de los anticuerpos m5F1, c5F1, c5F1-v17, c5F1-v24, c5F1-v25 purificados a una concentración que variaba de 8 a 32  $\mu\text{g/ml}$  y se añadieron a cada pocillo. Las células tratadas se mantuvieron en una incubadora a 37 °C durante 6 h antes de realizar el análisis FACS para apoptosis. Para el ensayo de apoptosis celular, la tinción con Anexina V se midió usando el Kit de Detección de Apoptosis de Anexina-V-FITC (Strong Biotech, Cat. nº AVK250) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las células tratadas se recogieron y se resuspendieron en tampón de unión de Anexina V que contenía Anexina V-FITC a temperatura ambiente. Después de 15 min de incubación en la oscuridad, las células se lavaron dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de unión de Anexina V. Antes de realizar el análisis FACS, se añadieron 0,25  $\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio (YP). Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo de BD-LSR (Becton Dickinson) usando el programa informático Cell Quest. Las células positivas a Anexina VI y/o positivas a YP se consideraron células apoptóticas. Los datos mostrados en la Tabla 11 muestran que todas las versiones ensayadas de los anticuerpos 5F1 pudieron inducir la apoptosis en células Colo205.

Tabla 11 (a, b). Inducciones de apoptosis en células Colo205

(a) Exp. 1			
	8 $\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$
m5F1	88	92	92
c5F1v0	34	60	70
c5F1v24	33	52	62
c5F1v25	26	43	50
mIgG1			17
hIgG1			18
(% de células positivas a Anexina V y/o a YP)			
(b) Exp. 2			
	8 $\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$
m5F1	89	94	96
c5F1v0	54	63	69
c5F1v17	51	56	60
mIgG1			26
hIgG1			27
(% de células positivas a Anexina V y/o a YP)			

Estudio de xenoinjerto

El día 0 se implantaron  $5 \times 10^6$  células Colo205 por vía subcutánea en la región del costado posterior de ratones SCID de 6-7 semanas de vida. El tratamiento con inyección intraperitoneal de anticuerpos a 30 mg/kg comenzó el día 0 después de la inoculación de las células tumorales y se repitió los días 4, 7, 11, 14 y 18. En cada grupo del experimento se usaron seis ratones. El crecimiento tumoral se evaluó basándose en mediciones del volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) realizadas con calibre dos veces por semana y el tamaño tumoral se calculó usando la fórmula:  $\pi/6 \times \text{diámetro más grande} \times (\text{diámetro más pequeño})^2$  (Kievit E, Cancer Research, 60: 6649-55). Los ratones se sacrificaron el día 21 y los tumores se aislaron y se pesaron. Los resultados mostrados en la Tabla 12 indican los efectos anti-tumorales de todos los anticuerpos ensayados en comparación con el tratamiento realizado con PBS.

Tabla 12: Estudio de xenoinjerto

	Tamaño del tumor ( $\text{mm}^3$ )	Peso del tumor (g)
PBS	521.695 $\pm$ 129.006	0.3228 $\pm$ 0.0707
c5F1v17 (30 mg/kg x 6)	169.698 $\pm$ 68.798*	0.0925 $\pm$ 0.0360*
c5F1v24 (30 mg/kg x 6)	44.108 $\pm$ 37.382*	0.0170 $\pm$ 0.0154*
c5F1v25 (30 mg/kg x 6)	111.093 $\pm$ 56.051*	0.0682 $\pm$ 0.0320*
*P < 0,01 en comparación con el tratamiento con PBS el Día 21 (ensayo de la t de Student)		

Efecto sinérgico de los anticuerpos SF1 en combinación con Oxaliplatino en la inducción de la apoptosis de células Colo205

Se sembraron  $1,4 \times 10^5$  de células Colo205 en pocillos de placas de 96 pocillos. Se prepararon alícuotas recientes de Oxaliplatino reconstituidas en una solución de glucosa al 5 % y se añadieron a cada pocillo a la concentración final de 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , junto con, o en combinación con, alícuotas de anticuerpos c5F1-v17, c5F1-v24, c5F1-v25 purificados y de control a las concentraciones finales de 10 y 30  $\mu\text{g/ml}$ . Las células tratadas se mantuvieron en una incubadora a 37 °C durante 24 h antes de realizar el análisis FACS para apoptosis. Para el ensayo de apoptosis celular, la tinción con Anexina V se midió usando el Kit de Detección de Apoptosis con Anexina-V-FITC (Strong Biotech, Cat. n° AVK250) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las células tratadas se recogieron y se resuspendieron en tampón de unión de Anexina V que contenía Anexina V-FITC a temperatura ambiente. Después de 15 min de incubación en la oscuridad, las células se lavaron dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de unión de Anexina V. Antes de realizar el análisis FACS, se añadieron 0,5  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio (YP). Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo BD-LSR (Becton Dickinson) usando el programa informático Cell Quest. Las células positivas a Anexina V y/o positivas a YP se consideraron células apoptóticas. Los datos de la Tabla 13 muestran el efecto sinérgico de todos los anticuerpos 5F1 ensayados en combinación con Oxaliplatino y la inducción de la apoptosis en células Colo205 cancerosas.

Tabla 13: Efectos de los anticuerpos 5F1 en combinación con Oxaliplatino

% de apoptosis*	Oxaliplatino 0	Oxaliplatino 1 $\mu\text{g/ml}$	Oxaliplatino 10 $\mu\text{g/ml}$
Anticuerpo 0	0	2	6
Hlg 30 $\mu\text{g/ml}$	1	4	2
c5F1v17 10 $\mu\text{g/ml}$	27	30	46
c5F1v17 30 $\mu\text{g/ml}$	49	55	62
c5F1v24 10 $\mu\text{g/ml}$	19	30	42
c5F1v24 30 $\mu\text{g/ml}$	31	49	54
c5F1v25 10 $\mu\text{g/ml}$	20	35	53
c5F1v25 30 $\mu\text{g/ml}$	44	54	63

\* Se sustrajo el fondo.

20

Unión e inducción de apoptosis del anticuerpo m5F1 a células de cáncer pancreático SU86.86

Se añadieron anticuerpos m5F1 y control purificados a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  a  $2 \times 10^5$  células SU86.86 y se incubaron durante 1 hora a 4 °C, se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 1 %, seguido por incubación con 1  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpos secundarios correspondientes (F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG (H+L) de ratón de cabra conjugado con R-PE, Southern Biotech, Cat. n° 1032-09) a 4 °C durante 30 min. Al final de la tinción, las muestras se lavaron dos veces con PBS que contenía FBS al 2 % y NaN<sub>3</sub> al 0,05 % y se analizaron mediante un citómetro de flujo. Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo de BD-LSR (Becton Dickinson) usando el programa informático Cell Quest.

30

Tabla 14. Unión de 5F1 a células SU.86.86

Anticuerpos	IFM
2° solo	6
m5F1	131

Se sembraron  $2 \times 10^5$  de células SU86.86 en pocillos de placas de 12 pocillos. En un medio de cultivo, se prepararon alícuotas recientes de m5F1 purificado a una concentración que variaba de 2 a 32  $\mu\text{g/ml}$  y se añadieron a cada pocillo. Para medir la señal de fondo se incluyó el anticuerpo de control a 32  $\mu\text{g/ml}$ . Las células tratadas se mantuvieron en una incubadora a 37 °C durante 6 h antes de realizar el análisis FACS para apoptosis. Para el ensayo de apoptosis celular, la tinción con Anexina V se midió usando el Kit de Detección de Apoptosis Anexina-V-FITC (Strong Biotech, Cat. n° AVK250) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las células tratadas se recogieron y se resuspendieron en tampón de unión de Anexina V que contenía Anexina V-FITC a temperatura ambiente. Después de 15 min de incubación en la oscuridad, las células se lavaron dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de tampón de unión de Anexina V. Antes del análisis FACS, se añadieron 0,25  $\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio (YP). Todos los análisis de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo BD-LSR (Becton Dickinson) usando el programa informático Cell Quest. Las células positivas a Anexina VI y/o positivas a YP se consideraron células apoptóticas.

45

Tabla 15. Inducción de apoptosis de SU86.86 por el anticuerpo m5F1

	0	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
mIgG1	ND	ND	ND	ND	ND	36
m5F1	36	60	72	78	89	91
(% de células positivas a Anexina V y/o a YP)						

Los datos mostrados en las Tablas 14 y 15 muestran que m5F1 pudo unirse a la línea celular de cáncer pancreático SU.86/86, y la unión de m5F1 indujo la apoptosis en células SU.86.86.

5 Los experimentos de unión se realizaron con los anticuerpos c5F1.v15, c5F1.v16, y c5F1.v2. Estos anticuerpos mostraron una unión significativa a células SU.86.86. El ensayo de apoptosis se realizó con el anticuerpo c5F1.v15. Los datos indican que este anticuerpo a una concentración de 8 µg/ml y 32 µg/ml induce la apoptosis de células SU.86.86 solo en presencia de un anti-IgG humano de ratón de entrecruzamiento que es específico del fragmento Fcγ (Jackson ImmunoResearch 209-005-098).

Referencias

15 Pimenidou, A., Madden, L.A., Topping, K.P., Smith, K.A., Monson, J.R., y Greenman, J. (2004) Novel CD43 specific phage antibodies react with early stage colorectal tumours. *Oncol. Rep.* 11(2): 327-31.

Fernandez-Rodriguez, J., Andersson, C.X., Laos, S., Baeckstrom, D., Sikut, A., Sikut, R., y Hansson, G.C. (2002) The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumour Biol.* 23(4): 193-201.

20 Cermak, L., Simova, S., Pintzas, A., Horejsi, V., y Andera, L. (2002) Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules. *J Biol Chem.* 8;277(10): 7955-61.

Carlow, D.A., Corbel, S.Y., y Ziltener, H.J. (2001) Absence of CD43 fails to alter T cell development and responsiveness. *J Immunol.* 166(1): 256-61.

25 Nieto, M., Rodriguez-Fernandez, J.L., Navarro, F., Sancho, D., Frade, J.M., Mellado, M., Martinez-A, C., Cabanas, C., y Sanchez-Madrid, F. (1999) Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation. *Blood.* 94(8): 2767-77.

Sikut, R., Andersson, C.X., Sikut, A., Fernandez-Rodriguez, J., Karlsson, N.G., y Hansson, G.C. (1999) Detection of CD43 (leukosialin) in colon adenoma and adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain. *Int. J. Cancer.* 82(1): 52-8.

30 Lopez, S., Seveau, S., Lesavre, P., Robinson, M.K., y Halbwachs-Mecarelli, L. (1998) CD43 (sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells. *Cell Adhes. Commun.* 5(2): 151-60.

Stockton, B.M., Cheng, G., Manjunath, N., Ardman, B., y von Andrian, U.H. (1998) Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity.* 8(3): 373-81.

35 McEvoy, L.M., Jutila, M.A., Tsao, P.S., Cooke, J.P., y Butcher, E.C. (1997) Anti-CD43 inhibits monocyte-endothelial adhesion in inflammation and atherogenesis. *Blood.* 90(9): 3587-94.

Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M., y Ardman, B. (1995) Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature.* 377(6549): 535-8

40 Pallant, A., Eskenazi, A., Mattei, MG., Fournier, R.E.K., Carlsson, S.R., Fukuda, M., y Frelinger, J.G. (1989) Characterization of cDNA encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1328-32.

Shelley, C.S., Remold-O'Donnell, E., Davis III, A.E., Bruns, G.A.P., Rosen, F.S., Carroll, M.C., y Whitehead, A.S. (1989) Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott- Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2819-23.

45

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que
  - 5 (a) la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, en la que la HCDR1 comprende SYVMH, la HCDR2 comprende YINPYNGGTQYNEKFKG y la HCDR3 comprende RTFPYYFDY; y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 9, en la que la región bisagra de la región constante de cadena pesada comprende al menos una inserción,
    - 10 deleción o sustitución de aminoácidos; y
    - (b) la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende las tres regiones determinantes de complementariedad de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, en la que la LCDR1 comprende RSSQSILHSNGNTYLE, la LCDR2 comprende KVSNRFS y la LCDR3 comprende FQGSHAPLT; y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10 y que
      - 15 adicionalmente comprende al menos una inserción de aminoácidos, en donde el anticuerpo se une a un epítipo de carbohidrato en el dominio extracelular de una CD43 humana y/o un ACE humano, expresado por una célula cancerosa no hematopoyética y que es capaz de inducir la apoptosis de la célula cancerosa no hematopoyética en ausencia de conjugación con citotoxina y de función inmunoefectora.
  - 20 2. Un anticuerpo aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que
    - (a) la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada que comprende las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, en la que la HCDR1 comprende SYVMH, la HCDR2 comprende YINPYNGGTQYNEKFKG y la HCDR3 comprende
      - 25 RTFPYYFDY; y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 25-30; y
      - (b) la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera que comprende las tres regiones determinantes de complementariedad de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, en la que la LCDR1 comprende RSSQSILHSNGNTYLE, la LCDR2 comprende KVSNRFS y la LCDR3 comprende FQGSHAPLT; y
        - 30 una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 10 y 31-37, en donde el anticuerpo se une a un epítipo de carbohidrato en el dominio extracelular de una CD43 humana y/o un ACE humano expresado por una célula cancerosa no hematopoyética y que es capaz de inducir la apoptosis de la célula cancerosa no hematopoyética en ausencia de conjugación con citotoxina y de función
          - 35 inmunoefectora.
    3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o quimérico.
    4. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de
      - 40 aminoácidos de las SEC ID N°: 27 o 29.
    5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-137 de la SEC ID N°: 1 y la región constante de cadena pesada comprende la
      - 45 secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 27, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-131 de la SEC ID N°: 2 y la región constante de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10, o la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-137 de la SEC ID N°: 1 y la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 29, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-131 de la SEC ID N°: 2 y la región constante de cadena ligera comprende la secuencia
        - 50 de aminoácidos de las SEC ID N°: 34 o 35.
      6. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-137 de la SEC ID N°: 1 y la región constante de cadena pesada comprende la
        - 55 secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 29, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de los restos 20-131 de la SEC ID N°: 2 y la región constante de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 34.
      7. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2 en donde el anticuerpo se conjuga con una citotoxina.
      8. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un
        - 60 transportador farmacéuticamente aceptable.
      9. Un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
      - 65 10. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las

reivindicaciones 1-7.

11. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 10.
- 5 12. Un método para producir un anticuerpo, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 11 que produce el anticuerpo codificado por el ácido nucleico y recuperar el anticuerpo del cultivo celular, o que comprende la expresión en una célula hospedadora,
- 10 (a) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica una cadena pesada, comprende una región variable de cadena pesada que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, en el que la HCDR1 comprende SYVMH, la HCDR2 comprende YINPYNGGTQYNEKFKG y la HCDR3 comprende RTFPYYFDY; y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 11-30; y
- 15 (b) un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de cadena ligera que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, en la que la LCDR1 comprende RSSQSILHSNGNTYLE, la LCDR2 comprende KVSNRFS y la LCDR3 comprende FQGSHAPLT; y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 10 y 31-37,
- 20 en donde los polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera se co-expresan en dicha célula hospedadora y en donde el anticuerpo se une a un epítipo de carbohidrato en el dominio extracelular de una CD43 humana y/o un ACE humano expresado por una célula cancerosa no hematopoyética y que es capaz de inducir la apoptosis de una célula cancerosa no hematopoyética en ausencia de conjugación con citotoxina y de función inmunoeffectora.
- 25 13. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de cáncer no hematopoyético en un individuo que tiene cáncer, en el que el anticuerpo se une a las células cancerosas del individuo.
- 30 14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el cáncer no hematopoyético es cáncer colorrectal, pancreático o gástrico.
15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el anticuerpo está conjugado con una citotoxina.
- 35 16. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en combinación con una cantidad de otro agente anticanceroso, opcionalmente un agente quimioterapéutico, y en el que el anticuerpo y el agente anticanceroso conjuntamente proporcionan un tratamiento eficaz del cáncer en el individuo.
- 40 17. Un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, e instrucciones para administrar a un individuo una cantidad eficaz de la composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer no hematopoyético, en donde, opcionalmente, el kit también comprende instrucciones para administrar a un individuo la composición farmacéutica junto con otro agente anticanceroso para tratar cáncer no hematopoyético o una segunda composición que comprende otro agente anticanceroso.
- 45



FIG. 2A

Lista de secuencias

			CH1	
V0 [H]	(SEC ID N° : 9)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V1	(SEC ID N° : 11)	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V2	(SEC ID N° : 12)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V3	(SEC ID N° : 13)	ASTKGPSVFPLVPGCSDTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V4	(SEC ID N° : 14)	ASTKGPSVFPLAPGCSDTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V5	(SEC ID N° : 15)	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V6	(SEC ID N° : 16)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V7	(SEC ID N° : 17)	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V8	(SEC ID N° : 18)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V9	(SEC ID N° : 19)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V10	(SEC ID N° : 20)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V11	(SEC ID N° : 21)	ASTKGPSVFPLVPGCSDTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V12	(SEC ID N° : 22)	ASTKGPSVFPLAPGCSDTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V13	(SEC ID N° : 23)	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V14	(SEC ID N° : 24)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V15	(SEC ID N° : 25)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V16	(SEC ID N° : 26)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V17	(SEC ID N° : 27)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V18	(SEC ID N° : 28)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V19	(SEC ID N° : 29)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
V20	(SEC ID N° : 30)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS	60	60
		***** . * . *****		
		Bisagra		
V0 [H]		GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKV	EPKS---	CDKTHTCPPCP APEL 117
V1		GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKV	EPKS---	SDKTHTCPPCP APEL 117
V2		GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKV	EPKS---	SDKTHTCPPCP APEL 117
V3		GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKV	EPKS---	SDKTHTCPPCP APEL 117
V4		GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKV	EPKS---	SDKTHTCPPCP APEL 117





FIG. 2D

V19 QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYITLPPS 240  
V20 QYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYITLPPS 240  
\*\*\*\*\*

V0 [H] CH3  
V1 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V2 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V3 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V4 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V5 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V6 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V7 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V8 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V9 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V10 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V11 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V12 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V13 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 298  
V14 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 298  
V15 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 296  
V16 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V17 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 298  
V18 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 297  
V19 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 300  
V20 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK 300  
\*\*\*\*\*

FIG. 2E

CH3

V0 [H]	<u>SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK</u>	330
V1	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V2	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V3	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V4	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V5	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V6	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V7	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V8	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V9	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V10	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V11	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V12	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V13	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	331
V14	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	331
V15	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	329
V16	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V17	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	331
V18	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	330
V19	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	333
V20	SRWQQGNVFSCVMHEALHNHHTQKSLSLSPGK	333

\*\*\*\*\*

FIG. 2F

```

sec. kappa (V19 + IC modificada)
V0 [L] (SEC ID N° :10) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V21 (SEC ID N° :31) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V22 (SEC ID N° :32) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V23 (SEC ID N° :33) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V24 (SEC ID N° :34) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V25 (SEC ID N° :35) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V26 (SEC ID N° :36) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
V27 (SEC ID N° :37) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 60
*****
V0 [L] SKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG---EC 107
V21 SKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG--EGEC 109
V22 SKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG-EGEC 110
V23 SKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGGEGEC 111
V24 SKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG---EC 108
V25 SKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGG--EC 109
V26 SKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGGG-EC 109
V27 SKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGGGGEC 109
*****

```

**FIG. 3**

Unión de anticuerpos 5F1 variantes con células COLO 205

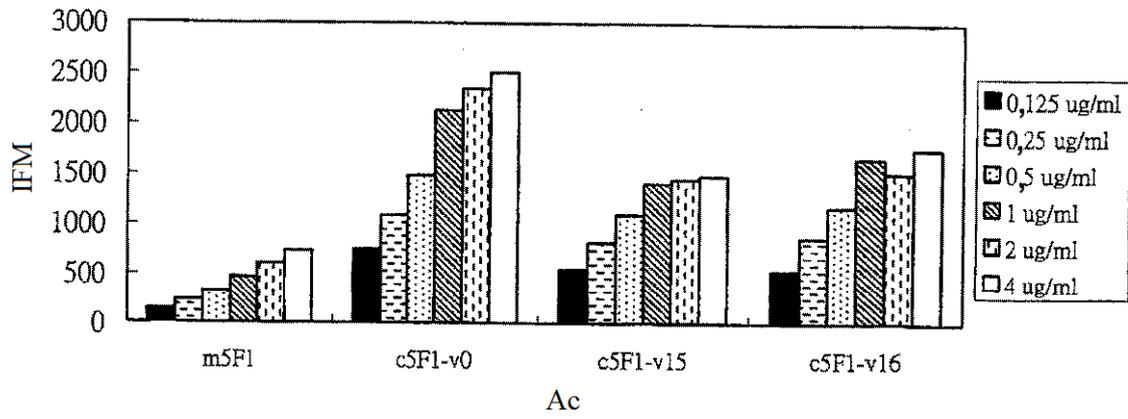




FIG. 4B

```

(b)
h5F1M _LC SEC ID N° : 92 Dir1 CDR1
h5F1MVa_LC SEC ID N° : 93 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RSSQSILHSNGNTYLE W
h5F1MVs_LC SEC ID N° : 94 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RSSQSILHSNGNTYLE W
h5F1AVa_LC SEC ID N° : 95 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RSSQSILHSNGNTYLE W
h5F1AVs_LC SEC ID N° : 96 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RSSQSILHSNGNTYLE W
*****

h5F1M _LC Dir2 CDR2 Dir3 CDR3
h5F1MVa_LC YQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSRFSGSGGTDFTLTISLSLQPDFATYFC FQGSHAP
h5F1MVs_LC YQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSRFSGSGGTDFTLTISLSLQPDFATYFC FQGSHAP
h5F1AVa_LC YQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSRFSGSGGTDFTLTKISRVEADLGTYYC FQGSHAP
h5F1AVs_LC YQKPGKAPKLLIY KVSNRFS GVPSRFSGSGGTDFTTFTISLSLQPEDIATYFC FQGSHAP
*****

h5F1M _LC Dir4
h5F1MVa_LC LT FGQGTKVELK
h5F1MVs_LC LT FGQGTKVELK
h5F1AVa_LC LT FGQGTKVEIK
h5F1AVs_LC LT FGQGTKVEIK
*****

```