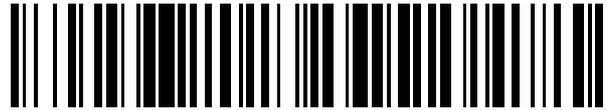


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 420**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2005 E 05739808 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 1761566**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanizados anti-TAG-72**

30 Prioridad:

05.06.2004 KR 2004041199

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

26.02.2016

73 Titular/es:

**KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE
AND BIOTECHNOLOGY (100.0%)
52, OEUN-DONG, YUSONG-GU
DAEJEON 305-333, KR**

72 Inventor/es:

**HONG, HYO JEONG;
KIM, SANG JICK;
YOON, SUN OK;
JANG, MYEONG HEE;
KIM, KEUN SOO;
LEE, TAE SUP y
CHOI, CHANG WOON**

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 561 420 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).

ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANIZADOS ANTI-TAG-72**DESCRIPCIÓN****5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados específicos frente a una glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), y a composiciones contra el cáncer que comprenden los anticuerpos humanizados.

10 Técnica anterior

La glicoproteína 72 asociada a tumores (denominada a continuación en el presente documento simplemente "TAG-72") es una proteína mucina, que es un antígeno asociado a tumores expresado en una amplia variedad de carcinomas humanos, incluyendo cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer de mama y cáncer de ovarios. Un anticuerpo monoclonal murino B72.3 es el primer anticuerpo específico frente a TAG-72, que se desarrolló usando una fracción de membrana de tejido de cáncer de mama humano como inmunógeno por el grupo del Dr. Jeffrey Schlom en el Instituto Nacional del Cáncer del NIH a principios de los años 1980 (Colcher *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(5):3199-3203). Más adelante, el mismo grupo de investigación desarrolló anticuerpos de segunda generación que tenían una afinidad de unión a antígeno mayor que B72.3, tales como CC49 y CC83 (Muraro *et al.*, 1988, Cancer Res., 48(16):4588-4596).

Se encontró que CC49 o CC83 se une a más del 80% de los cánceres de colon y aproximadamente al 50% de los cánceres de mama, pero que raramente se une a tejidos normales. Además, la obtención de imágenes *in vivo* usando CC49 o CC83 marcado con ¹³¹I en pacientes con cáncer dio como resultado la detección de cáncer primario y cáncer metastatizado (Divgi *et al.*, 1994, Nucl. Med. Biol., 21(1):9-15). Sin embargo, la administración repetida de los anticuerpos monoclonales murinos al organismo producía efectos secundarios o eficacia terapéutica reducida al inducir respuestas inmunitarias en el organismo. Con el fin de minimizar estas respuestas inmunitarias no deseadas, se han construido anticuerpos humanizados injertando regiones determinantes de complementariedad (CDR) y algunos residuos de aminoácido de una región de entramado (FR) de anticuerpos murinos en un anticuerpo humano (Owens *et al.*, 1994, J. Immunol. Methods, 168(2):149-65). Se notificó que estos anticuerpos humanizados reducían enormemente las respuestas inmunitarias no deseadas en pacientes cuando se administraban repetidamente a los pacientes (Brown *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:2663).

En un estudio que implicaba anticuerpos humanizados contra el antígeno TAG-72, se desarrolló un anticuerpo humanizado (HuCC49) del anticuerpo monoclonal murino CC49 injertando CDR del anticuerpo monoclonal murino CC49 en FR de cadena ligera y pesada de anticuerpos monoclonales humanos, mientras se mantenían aquellos residuos de región de entramado murinos que se requieren para la conservación de la estructura de sitio de combinación con el antígeno (Kashmiri *et al.*, Hybridoma 14:461-473, 1995).

La patente estadounidense n.º 5.976.531 describe un anticuerpo Hum4 V_L, V_H específico frente a TAG-72, que consiste en una región variable de cadena ligera (V_L), que está codificada por ADN derivado de un gen de línea germinal de subgrupo IV kappa humano (Hum4 V_L), y una región variable de cadena pesada (V_H) que puede combinarse con la V_L para formar una estructura tridimensional que tiene capacidad para unirse específicamente a TAG-72.

La patente estadounidense n.º 6.495.137 da a conocer un anticuerpo humanizado anti-TAG-72 o un fragmento del mismo, que comprende una cadena ligera injertada con CDR que tiene CDR de cadena ligera de un anticuerpo murino anti-TAG-72 injertados en Hum4V_L, en el que el anticuerpo murino anti-TAG-72 se selecciona de entre CC49, CC83, CC46, CC92, CC30 y CC11.

Se desarrollaron otros diversos anticuerpos humanizados contra TAG-72. Sin embargo, existe la necesidad de desarrollar anticuerpos humanizados anti-TAG-72 que tengan alta capacidad de unión a antígeno y un riesgo reducido de inducir respuestas inmunitarias en seres humanos.

A este respecto, los presentes inventores, tal como se describe en la patente coreana n.º 0318761 presentada por los presentes inventores, identificaron genes humanos que tenían secuencias lo más similares a secuencias de CDR y FR de un anticuerpo murino anti-TAG-72, prepararon genes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo humanizado usando los genes humanos identificados, clonando los genes obtenidos en un vector de expresión, transformando una célula huésped con el vector de expresión, y cultivando la célula huésped, desarrollando de ese modo un anticuerpo humanizado anti-TAG-72, AKA/HzK. En comparación con el anticuerpo humanizado HuCC49, el anticuerpo humanizado AKA/HzK tiene CDR y FR en los que están reemplazados residuos de aminoácido por aminoácidos más similares a los de seres humanos y por tanto tiene inmunogenicidad reducida en seres humanos, a la vez que mantiene sustancialmente una capacidad de unión a antígeno aproximadamente similar a la del anticuerpo HuCC49. Pese a este desarrollo, todavía existe la necesidad de anticuerpos funcionalmente excelentes que tengan un riesgo reducido de inducir respuestas inmunitarias en seres humanos y capacidad y afinidad de unión a antígeno mejoradas.

Lim *et al.* Journal of Nuclear Medicine Vol. 43, n.º 5, Supl., 2002 página 269P es un resumen de reuniones que menciona (pero no da a conocer de otro modo) el anticuerpo 3E8 usado en la solicitud.

5 Los documentos WO 00/26394, WO 99/43816 y WO 2005/047338 dan a conocer todos ellos anticuerpos contra TAG-72, pero no con secuencias según las reivindicaciones 1 ó 3

El documento KR 100 318 761 da a conocer anticuerpos humanizados según SEQ ID NO. 1.

10 Basándose en estos antecedentes, los presentes inventores, con el fin de preparar un anticuerpo que tenga capacidad y afinidad de unión a TAG-72 excelentes, prepararon una biblioteca de cadenas pesadas humanizadas mediante mutagénesis al azar de la CDR3 de región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado AKA/HzK, y realizaron un ensayo de transferencia de colonias usando las células que expresan la biblioteca para
15 seleccionar clones mutantes de Fab que tienen alta capacidad de unión a antígeno. Se evaluaron los clones seleccionados para determinar su capacidad de unión a antígeno mediante ELISA competitivo. Como resultado, se construyó un anticuerpo novedoso tiene capacidad de unión a antígeno y afinidad de unión a antígeno a TAG-72 potenciadas. Además, los presentes inventores construyeron un anticuerpo humanizado reemplazando una cadena ligera del anticuerpo humanizado novedoso por una cadena ligera humana, conduciendo de ese modo a la presente invención.

20 **Divulgación de la invención**

Por tanto un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo humanizado contra la glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), que comprende (i) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de
25 aminoácidos de SEQ ID No. 2 a 6, y (ii) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21 ó 22.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un vector recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena pesada y la secuencia de ácido nucleico que
30 codifica para la región variable de cadena ligera.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar un transformante transformado con los vectores recombinantes.

35 Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de preparación del anticuerpo humanizado cultivando el transformante.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición contra el cáncer que comprende el anticuerpo humanizado.

40 Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición que comprende un anticuerpo humanizado para su uso en el diagnóstico de cáncer.

45 **Breve descripción de los dibujos**

Los objetos anteriores y otros, las características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

50 la figura 1 es una presentación esquemática de un procedimiento para construir un vector de expresión de un anticuerpo mutado mutando al azar residuos de aminoácido en las posiciones 99 a 103 de una secuencia de aminoácidos que codifica para la HCDR3 de cadena pesada de un anticuerpo humanizado AKA/HzK contra una glicoproteína asociada a tumores TAG-72, que está representada por SEQ ID No. 1;

55 la figura 2 es una presentación esquemática de un ensayo de transferencia de colonias para seleccionar clones mutantes de Fab que tienen alta afinidad de unión a antígeno;

la figura 3 muestra secuencias de aminoácidos de regiones variable de cadena pesada de clones mutantes que tienen alta afinidad de unión a antígeno;

60 la figura 4 es una representación esquemática de un procedimiento para construir un plásmido para la expresión de un mutante 3E8 que tiene la afinidad de unión a antígeno más alta en forma de IgG completa;

las figuras 5a y 5b son gráficos en los que se comparan los anticuerpos 3E8, 3C4, 3D5, NV y NI en forma de IgG en cuando a su capacidad de unión a antígeno con un anticuerpo convencional AKA/Hzk en forma de IgG;

65 la figura 6 es una fotografía de gel de la separación electroforética de un anticuerpo de la presente invención en

condiciones de reducción y no reducción, en la que se determinan los pesos moleculares del anticuerpo y sus subunidades (carril 1: condición de reducción; carril 2: condición de no reducción);

5 la figura 7 es una alineación de secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera humana de un anticuerpo 3E8/BSM22 y una región variable de cadena ligera de un anticuerpo AKA/HzK convencional;

la figura 8 es una representación esquemática de un procedimiento para construir un plásmido para la expresión de un anticuerpo 3E8/BSM22 en forma de IgG completa;

10 la figura 9 es un gráfico en el que se compara la afinidad de unión a antígeno de los anticuerpos de 3E8 y 3E8/BSM22 con la de AKA/HzK (○: 3E8; ▼: 3E8/BSM22; ●: AKA/HzK);

15 la figura 10 muestra gráficamente la distribución *in vivo* y la capacidad de direccionamiento a tumor de los anticuerpos AKA/HzK y 3E8, en la que se inyectaron por vía intravenosa ¹²⁵I-AKA/HzK (panel A) y ¹²⁵I-3E8 (panel B) en un modelo de xenoinjerto de ratón atómico de cáncer de colon humano y se evaluaron su biodistribución y direccionamiento a tumor en los ratones;

20 la figura 11 muestra gráficamente la eficacia radioinmunoterápica de un anticuerpo 3E8, que se determina midiendo el efecto inhibitor del anticuerpo 3E8 sobre el crecimiento tumoral, en la que se estimaron el tiempo de duplicación de tumor (Td; panel A) y los cambios en peso corporal (panel B) en ratones a los que se administraron ¹³¹I-3E8 (●) y 3E8 (■); y

25 la figura 12 muestra gráficamente la eficacia radioinmunoterápica de un anticuerpo 3E8, que se determina midiendo las tasas de supervivencia de ratones, en la que se estimaron las tasas de supervivencia (panel A) y los cambios en el peso corporal (panel B) en ratones a los que se administraron ¹³¹I-3E8(●) y 3E8(■).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado contra la glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), que comprende (i) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nos. 2 a 6, y (ii) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21 ó 22

35 Los anticuerpos derivados de ratón inducen respuestas inmunitarias no deseadas en seres humanos porque se reconocen como antígenos en seres humanos, y se producen nuevos anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) contra los anticuerpos de ratón, induciendo de ese modo respuestas inmunitarias no deseadas. Se han realizado muchos intentos para superar este problema reduciendo la inmunogenicidad de los anticuerpos no humanos en seres humanos. Las denominadas técnicas de humanización normalmente emplean una técnica de ADN recombinante que manipula una secuencia de ADN que codifica para una cadena de polipéptido de una molécula de anticuerpo. El método de preparación inicial de anticuerpos humanizados se basa en crear un anticuerpo quimérico en el que se fusiona una región constante de anticuerpos humanos con un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo no humano. La publicación de patente internacional n.º WO86/01533 da a conocer un método de preparación de un anticuerpo quimérico, que se humaniza uniendo sólo una región variable derivada de anticuerpos murinos a una región constante de anticuerpo humano. Este anticuerpo quimérico tiene las ventajas de presentar menores respuestas inmunitarias que los anticuerpos murinos y de tener funciones mejoradas. Sin embargo, puesto que los anticuerpos quiméricos todavía contienen regiones variables de ratón, es decir, secuencias de aminoácidos de regiones variables no humanas, producen respuestas de HAMA cuando se administran repetidamente a seres humanos.

50 Con el fin de humanizar adicionalmente anticuerpos quiméricos, se han realizado muchos intentos para recombinar CDR de anticuerpos monoclonales murinos que presentan capacidad de unión a antígeno con FR de anticuerpos humanos, basándose en el concepto de que la recombinación no induce respuestas inmunitarias en seres humanos a la vez que mantienen la especificidad y afinidad de unión a antígeno de los anticuerpos murinos (Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 4:321(6069):522-525). Los anticuerpos humanizados preparados mediante injerto de CDR, que se basa en injertar bucles de CDR de anticuerpos murinos en anticuerpos humanos, contienen muchas menos secuencias de aminoácidos no humanas y por tanto tienen un riesgo reducido de respuestas de HAMA en comparación con los anticuerpos quiméricos, pero pueden tener afinidad de unión a antígeno menor. Pueden requerirse FR de anticuerpos murinos originales para permitir que los anticuerpos humanizados mantengan la capacidad de sus anticuerpos originales para unirse a sus antígenos. A este respecto, cuando se reemplazaron varios residuos de aminoácido de FR que se consideraba que afectaban a la estructura de CDR por los de un anticuerpo murino, se potenció la afinidad de unión a antígeno de un anticuerpo humanizado hasta niveles similares a los del anticuerpo murino original (Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332: 323-327; Queen *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 10023-10029; Tempest *et al.*, 1991, *Biol. Technology*, 9:266-271; Co *et al.*, 1991, *Nature*, 351:501-502).

65 El término "anticuerpo humanizado", tal como se usa en el presente documento, tal como se describió anteriormente,

significa en general un anticuerpo que no es inmunogénico o tiene inmunogenicidad reducida en seres humanos. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos alterada, y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo puede reconstituirse según los fines deseados. Son posibles un gran número de cambios, que oscilan entre cambios de uno o varios aminoácidos y reconstitución completa de las regiones variable y/o constante de un anticuerpo. Normalmente, se realizan variaciones de regiones variables para potenciar la capacidad y afinidad de unión a un antígeno, y se realizan variaciones en regiones constantes para mejorar las funciones efectoras, tales como la fijación al complemento y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

El anticuerpo humanizado de la presente invención es un anticuerpo que se obtiene mutando la CDR3 de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo humanizado, AKA/HzK, que construyeron los presentes inventores antes de la presente. El anticuerpo humanizado de la presente invención tiene capacidad y afinidad de unión a antígeno mejoradas en comparación con AKA/HzK, que tiene una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 1 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21.

El término "región variable", tal como se usa en el presente documento, significa una parte de una molécula de anticuerpo, que funciona para unirse específicamente a un antígeno y muestra muchas variaciones en secuencia. Están presentes tres regiones determinantes de complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3, en una región variable. Las "regiones determinantes de complementariedad (CDR)" son regiones similares a bucles que participan en el reconocimiento de antígeno, y la especificidad de un anticuerpo por un antígeno se determina según cambios en secuencias de CDR. En detalle, en la presente invención se construyó un anticuerpo con afinidad de unión a antígeno mejorada mediante una variación en una secuencia de aminoácidos de CDR3. Las "regiones de entramado (FR)", interpuestas entre CDR en una orientación apropiada, sirven para mantener los bucles de CDR, e incluyen FR1, FR2, FR3 y FR4. La región variable de cadena pesada de anticuerpo de la presente invención se compone de una FR1 que abarca las posiciones 1 a 30, una CDR1 que abarca las posiciones 31 a 35, una FR2 que abarca las posiciones 36 a 49, una CDR2 que abarca las posiciones 50 a 66, una FR3 que abarca las posiciones 67 a 98, una CDR3 que abarca las posiciones 99 a 104 y una FR4 que abarca las posiciones 105 a 115. La región variable de cadena ligera de anticuerpo de la presente invención se compone de una FR1 que abarca las posiciones 1 a 23, una CDR1 que abarca las posiciones 24 a 40, una FR2 que abarca las posiciones 41 a 55, una CDR2 que abarca las posiciones 56 a 62, una FR3 que abarca las posiciones 63 a 94, una CDR3 que abarca las posiciones 95 a 103 y una FR4 que abarca las posiciones 104 a 113.

Los presentes inventores encontraron que cuando el residuo de asparagina (Asn) en la posición 101 (n.º de Kabat: 97) de la CDR3 de una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 está reemplazado por un residuo alifático, el anticuerpo humanizado tiene afinidad potenciada por TAG-72. En la presente invención, el residuo alifático significa isoleucina, valina, leucina o alanina.

En un aspecto detallado, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado contra TAG-72, que comprende (i) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, en la que un residuo de asparagina en la posición 101 (n.º de Kabat: 97) está reemplazado por un residuo alifático, por ejemplo, isoleucina, valina, leucina o alanina, y un residuo de leucina en la posición 100 (n.º de Kabat: 96) está reemplazado por un residuo de triptófano, y/o un residuo de metionina en la posición 102 (n.º de Kabat: 98) está reemplazado por un residuo de glutamina, y/o un residuo de alanina en la posición 103 (n.º de Kabat: 99) está reemplazado por un residuo de glutamina o glicina, y (ii) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21.

Más preferiblemente, en la región variable de cadena pesada, el residuo de asparagina en la posición 101 está reemplazado por valina, el residuo de metionina en la posición 102 por glutamina, y el residuo de alanina en la posición 103 por glicina. Por tanto, se proporciona un anticuerpo humanizado anti-TAG-72, 3C4, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 2 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21. Además, más preferiblemente, en la región variable de cadena pesada, el residuo de asparagina en la posición 101 está reemplazado por isoleucina, el residuo de metionina en la posición 102 por glutamina, y el residuo de alanina en la posición 103 por glicina. Por tanto, se proporciona un anticuerpo humanizado anti-TAG-72, 3D5, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 3 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21. Además, más preferiblemente, en la región variable de cadena pesada, el residuo de asparagina en la posición 101 está reemplazado por isoleucina, el residuo de leucina en la posición 100 por triptófano, y el residuo de alanina en la posición 103 por glutamina. Por tanto, se proporciona un anticuerpo humanizado anti-TAG-72, 3E8, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 4 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21. Además, más preferiblemente, en la región variable de cadena pesada, el residuo de asparagina en la posición 101 está reemplazado por valina. Por tanto, se proporciona un anticuerpo humanizado anti-TAG-72, NV, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 5 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21.

Además, más preferiblemente, en la región variable de cadena pesada, el residuo de asparagina en la posición 101 está reemplazado por isoleucina. Por tanto, se proporciona un anticuerpo humanizado anti-TAG-72, NI, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 6 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21.

Los anticuerpos mencionados anteriormente tienen afinidad potenciada en gran medida en comparación con el anticuerpo AKA/HzK convencional. El anticuerpo 3C4 completo tiene una afinidad de unión a antígeno (K_D) de $1,33 \times 10^{-9}$ M, el anticuerpo 3D5 completo tiene una K_D de $2,27 \times 10^{-9}$ M, y el anticuerpo 3E8 completo tiene una K_D de $0,65 \times 10^{-9}$ M. Estos valores de K_D son respectivamente de manera aproximada 11,6 y 22 veces mayores que el valor de K_D de $1,45 \times 10^{-8}$ M de AKA/HzK. El anticuerpo NV completo tiene una K_D de $1,66 \times 10^{-9}$ M y el anticuerpo NI completo tiene una K_D de $3,38 \times 10^{-9}$ M. Estos valores de K_D son respectivamente de manera aproximada 8 y 4 veces mayores que el valor de K_D de $1,45 \times 10^{-8}$ M de AKA/HzK.

Los presentes inventores se propusieron reemplazar una cadena ligera de los anticuerpos por una cadena ligera humana.

Con el fin de seleccionar una cadena ligera humana que pueda usarse junto con una región variable de cadena pesada de los anticuerpos humanizados reemplazando una cadena ligera humanizada, se preparó una biblioteca de cadenas ligeras humanas a partir de linfocitos de sangre periférica (PBL) humanos. Se insertaron fragmentos de ADN de cadena ligera humana en un vector de expresión de Fab de un anticuerpo humanizado 3E8 que mostraban el mejor efecto, pC3-Q-3E8, en lugar de un gen de cadena ligera humanizada, y se realizó un ensayo de transferencia de colonias para seleccionar clones mutantes que tenían fuerte capacidad de unión a antígeno. Se aislaron los clones de células que tenían mejor capacidad de unión a antígeno que Fab de 3E8 de tipo natural, y se sometieron sus regiones variables de cadena ligera a secuenciación de ADN. La secuenciación de ADN reveló que un clon tiene una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 22. La región variable de cadena ligera humana que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 22, obtenida de esta manera, puede reemplazar una región variable de cadena ligera de los anticuerpos humanizados mediante una técnica de ADN recombinante usada comúnmente.

En otro aspecto detallado, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado contra TAG-72, que comprende (i) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 4, y (ii) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 22.

Lo más preferible es un anticuerpo humanizado, 3E8/BSM22, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 4 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 22. El anticuerpo 3E8/BSM22 completo tiene una afinidad de unión a antígeno (K_D) de $0,45 \times 10^{-9}$ M, que es aproximadamente 1,5 veces mayor que $0,65 \times 10^{-9}$ M para el anticuerpo 3E8.

En la presente invención, un "anticuerpo" incluye una forma de anticuerpo completo y fragmentos funcionales de una molécula de anticuerpo. Un anticuerpo completo consiste en dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa, en el que cada cadena ligera se une a una cadena pesada a través de enlaces disulfuro. El término "fragmentos funcionales de una molécula de anticuerpo" indica fragmentos que mantienen las funciones de unión a antígeno, e incluyen Fab, F(ab'), F(ab')₂ y Fv. Entre los fragmentos de anticuerpo, Fab contiene las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada, la región constante de la cadena ligera y la primera región constante (CH1) de la cadena pesada, y tiene un único sitio de unión a antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en lo que se refiere a la región bisagra que contiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C-terminal del dominio CH1 de cadena pesada. Los fragmentos F(ab')₂ se producen como un par de fragmentos Fab' mediante unión disulfuro formada entre residuos de cisteína de las regiones bisagra de los fragmentos Fab'. Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene sólo la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera. Técnicas recombinantes para producir los fragmentos Fv se describen en las publicaciones de patente internacionales n.ºs WO88/10649, WO88/106630, WO88/07085, WO88/07086 y WO88/09344. El fragmento Fv unido mediante enlaces disulfuro (dsFv) comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera que se unen entre sí mediante enlaces disulfuro. El fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera que se unen covalentemente entre sí mediante un enlace peptídico.

Estos fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse usando enzimas proteolíticas (por ejemplo, los anticuerpos completos se digieren con papaína para producir fragmentos Fab, y los tratamientos con pepsina dan como resultado la producción de fragmentos F(ab')₂), y pueden prepararse preferiblemente mediante técnicas de ADN recombinante. En la presente invención, un anticuerpo está preferiblemente en forma de Fab o en forma de anticuerpo completo.

Los anticuerpos humanizados proporcionados en la presente invención pueden unirse a todos los tipos de regiones constantes mediante una técnica de ADN recombinante. Hay cinco tipos distintos de cadenas pesadas basándose

en las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) y épsilon (ϵ), y las cadenas pesadas incluyen las siguientes subclases: gamma 1 (γ_1), gamma 2 (γ_2), gamma 3 (γ_3), gamma 4 (γ_4), alfa 1 (α_1) y alfa 2 (α_2). Además, hay dos tipos de cadena ligeras basándose en las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: tipos kappa (κ) y lambda (λ) (Coleman *et al.*, Fundamental Immunology, 2ª Ed., 1989, 55-73). Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es gamma 1 o gamma 3, y lo más preferiblemente, el isotipo gamma 1. Preferiblemente, la región constante de cadena ligera es el tipo kappa.

Las regiones constantes de los anticuerpos de la presente invención incluyen variantes que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Preferiblemente, una variante de región constante de inmunoglobulina es una variante que tienen estabilidad estructural mejorada, por ejemplo, contra calor, pH, o similar, o solubilidad mejorada, o que tiene actividades biológicas mejoradas, tales como formación de enlace disulfuro, afinidad por huéspedes de expresión, unión a complemento, asociación con receptores de Fc y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, mediante la alteración y modificación de secuencias de aminoácidos, siempre que la variante no induzca respuestas inmunitarias.

La presente invención describe secuencias de ácido nucleico que codifican para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

Preferiblemente, las secuencias de ácido nucleico codifican para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 2, 3, 4, 5 ó 6.

Más preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 2 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 16. La secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 3 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 17. La secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 4 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 18. La secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 5 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 19. La secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 6 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 20.

La secuencia de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena ligera codifica para una región variable de cadena ligera representada por SEQ ID No. 22. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 23.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican para el anticuerpo variable y regiones constantes se insertan en un vector recombinante de expresión y se expresan.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un vector recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena pesada y la secuencia de ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena ligera según la invención.

Un vector recombinante preferido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID Nos. 2 a 6 y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID Nos. 21 y 22. En la práctica detallada, se proporciona un vector recombinante que es pC3-Q-3C4, pC3-Q-3D5, pC3-Q-3E8, pC3-Q-NV, pC3-Q-NI o pC3-Q-3E8/BSM22. Además, se proporciona un vector recombinante que es pdCMV-dhfr-3C4, pdCMV-dhfr-3D5, pdCMV-dhfr-3E8, pdCMV-dhfr-NV, pdCMV-dhfr-NI o pdCMV-dhfr-3E8/BSM22.

El término "vector recombinante", tal como se usa en el presente documento, que describe un vector de expresión que puede expresar una proteína de interés en una célula huésped adecuada, se refiere a un constructo genético que comprende elementos reguladores esenciales al que está operativamente unido un inserto génico de tal manera que se expresa en una célula huésped.

El término "operativamente unido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una unión funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácidos nucleicos y una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína diana de tal manera que permite funciones generales. La unión operativa a un vector recombinante puede prepararse usando una técnica recombinante genética bien conocida en la técnica, y puede lograrse fácilmente escisión y ligación de ADN específicas de sitio usando enzimas conocidas en general en la técnica.

Un vector de expresión adecuado en la presente invención incluye elementos reguladores de la expresión, tales como un promotor, un codón de iniciación, un codón de terminación, una señal de poliadenilación y un potenciador, así como secuencias señal para secreción o direccionamiento a membrana. Se considera en general que los codones de iniciación y terminación son una parte de una secuencia de nucleótido que codifica para una proteína diana inmunogénica, es necesario que sean funcionales en un individuo al que se ha administrado un constructo

genético y deben estar en marco con la secuencia codificante. Los promotores pueden ser en general constitutivos o inducibles. Los ejemplos no limitativos de promotores disponibles en células procariotas incluyen los promotores lac, tac, T3 y T7. Los ejemplos no limitativos de promotores disponibles en células eucariotas incluyen el promotor del virus de simio 40 (SV40), el promotor del virus de tumor mamario de ratón (VTMM), el promotor de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) del VIH, el promotor del virus Moloney, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus de Epstein Barr (EBV), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como actina β humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano y metalotioneína humana.

Un vector de expresión puede incluir un marcador seleccionable que permite la selección de las células huésped que contienen el vector. Se usan genes que codifican para productos que confieren fenotipos seleccionables, tales como resistencia a fármacos, necesidad de nutrientes, resistencia a agentes citotóxicos o expresión de proteínas de superficie, como marcadores seleccionables generales. Puesto que sólo sobreviven las células que expresan un marcador seleccionable en el entorno tratado con un agente selectivo, pueden seleccionarse las células transformadas. Además, un vector de expresión replicable puede incluir un origen de replicación, una secuencia de ácido nucleico específica que inicia la replicación. Además, se dispone de virus (por ejemplo, vaculovirus) o vectores de fagos y vectores que pueden integrarse en el genoma de células huésped, tales como vectores de retrovirus.

Un anticuerpo completo o fragmento de anticuerpo puede producirse usando un sistema de vector que expresa simultáneamente una cadena ligera y una cadena pesada en un solo vector, o un sistema que expresa una cadena ligera y una cadena pesada en dos vectores separados. En este último caso, los dos vectores se introducen en las células huésped mediante cotransformación o transformación dirigida. En la transformación dirigida, se seleccionan las células transformadas con un vector que contiene un gen de cadena ligera (o cadena pesada), y de nuevo se transforman las células seleccionadas que expresan la cadena ligera (o cadena pesada) con un vector que contiene un gen de cadena pesada (cadena ligera) para seleccionar finalmente las células que expresan tanto cadenas ligeras como pesadas.

Para construir un anticuerpo en forma de Fab, se usa un vector en el que se insertan genes que codifican para aminoácidos de una región variable (VL) y una región constante (CL) de cadena ligera humana y una región variable de cadena pesada humana (VH) y un primer dominio de región constante (CH1). En la práctica detallada, se usa un vector pComb3HSS. Un vector más preferido es pC3-Q en el que una secuencia de aminoácidos EVQL (ácido glutámico-valina-glutamina-leucina) antes de un sitio XhoI del vector se modifica para dar QVQL (glutamina-valina-glutamina-leucina) para mantener el primer residuo de aminoácido de la cadena pesada, glutamina, y/o se elimina un gene III para expresar un Fab soluble. Este vector posee un promotor lacZ y los péptidos señal OmpA y pelB.

En un aspecto preferido, la presente invención proporciona pC3-Q-3C4 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 2 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pC3-Q-3D5 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 3 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pC3-Q-3E8 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 4 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pC3-Q-NV que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 5 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pC3-Q-NI que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 6 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pC3-Q-3E8/BSM22 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 4 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 22.

Para construir un anticuerpo completo, se usa un vector en el que se inserta un gen que codifica para un aminoácido de la región variable (VL) y la región constante (CL) de cadena ligera humana y la región variable de cadena pesada humana (VH) y todos los dominios de región constante (CH1, CH2 y CH3). En la práctica detallada de la presente invención, se usó pdCMV-dhfr que tiene dos unidades de expresión, que se construyó usando pCMV-dhfr (KCTC 8671P: n.º de registro de patente coreana 162021). El vector posee dos promotores de CMV y se expresan las cadenas pesada y ligera a partir de promotores respectivos.

En un aspecto preferido, la presente invención proporciona pdCMV-dhfr-3C4 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 2 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pdCMV-dhfr-3D5 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 3 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pdCMV-dhfr-3E8 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 4 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pdCMV-dhfr-NV que comprende una región variable de cadena

pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 5 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pdCMV-dhfr-NI que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 6 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21, pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22 que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 4 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 22, y similares.

Entre los vectores recombinantes, se depositó el vector pdCMV-dhfr-3E8 que expresa un anticuerpo 3E8 completo en la KCTC (Colección Coreana de Cultivos Tipo; 52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, Corea) el 21 de junio de 2001 y se le asignó el número de registro KCTC 1039BP. Se depositó el vector pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22 que expresa un anticuerpo 3E8/BSM22 completo en la KCTC el 31 de mayo de 2004 y se le asignó el número de registro KCTC 10647BP.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere un transformantes transformados con los vectores recombinantes.

Las células huésped adecuadas para los vectores pueden ser células procariotas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis* o *Staphylococcus*. Además, las células eucariotas útiles como células huésped incluyen células eucariotas inferiores, tales como hongos (por ejemplo, especies de *Aspergillus*) y levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces, Neurospora crassa*), y células derivadas de eucariotas superiores, tales como células de insecto. Las células huésped también pueden derivarse de plantas y mamíferos. Las células preferidas incluyen, pero no se limitan a, células COS7 (células de riñón de mono), células NSO, SP2/0, células CHO (de ovario de hámster chino), células W138, células BHK (de riñón de hámster recién nacido), células MDCK, células de mieloma, células HuT 78 y células 293. Se prefieren las células CHO. Se transformó el vector pdCMV-dhfr-3E8 de la presente invención en células CHO usando Lipofectamine, produciendo de ese modo una línea celular transformada 9E8, que se depositó en la KCTC el 21 de junio de 2001 y se le asignó el número de registro KCTC 1040BP. Además, se transformó el vector pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22 de la presente invención en células CHO, produciendo de ese modo una línea celular transformada 4D12-B31, que se depositó en la KCTC el 31 de mayo de 2004 y se le asignó el número de registro KCTC 10646BP.

En la presente invención, la "transformación" en células huésped incluye cualquier método mediante el cual pueden introducirse ácidos nucleicos en microorganismos, células, tejidos u órganos, y tal como se conoce en la técnica, puede realizarse seleccionando técnicas convencionales adecuadas según las células huésped. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, electroporación, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio (CaPO_4), precipitación con cloruro de calcio (CaCl_2), agitación con fibra de carburo de silicio, transformación mediada por agrobacterias y transformación mediada por PEG, sulfato de dextrano, Lipofectamine y desecación/inhibición.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de preparación del anticuerpo humanizado cultivando el transformante.

En el método de preparación de anticuerpo, el cultivo del transformante puede realizarse usando medios en condiciones de cultivo adecuadas, que se conocen en la técnica. Este procedimiento de cultivo puede adaptarse fácilmente según las cepas seleccionadas por los expertos en la técnica.

El anticuerpo obtenido cultivando el transformante puede usarse en forma purificada, o puede usarse tras purificarse usando diversos métodos generales, que pueden usarse por separado o en combinación, por ejemplo, diálisis, precipitación con sal y cromatografía. Entre ellos, la cromatografía es el más usado comúnmente. Ejemplos de cromatografía incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad.

Un anticuerpo preparado mediante el método mencionado anteriormente tiene afinidad potenciada por un antígeno. El término "afinidad" es la capacidad para reconocer y unirse específicamente a una región específica de un antígeno. La alta afinidad así como la especificidad de un anticuerpo por un antígeno son elementos críticos en respuestas inmunitarias. En la presente invención, una región variable de cadena pesada se muta al azar para preparar células de biblioteca de cadenas pesadas humanizadas, y las células de biblioteca se someten a un ensayo de transferencia de colonias para seleccionar clones mutantes que tienen alta capacidad de unión a antígeno. Se evaluaron los clones seleccionados para determinar su afinidad mediante ELISA competitivo. Pueden usarse otros métodos diversos, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SRP), para medir la afinidad de un anticuerpo a un antígeno.

El término " K_D ", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una constante de disociación de interacción anticuerpo-antígeno específica, y se ha usado para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno. El presente anticuerpo preparado mediante el método mencionado anteriormente tenía una capacidad mucho mejor para unirse a un antígeno TAG-72 que el anticuerpo original AKA/HzK.

Por tanto, un anticuerpo que tiene afinidad potenciada, preparado mediante el método anterior, puede ser útil para diagnosticar y tratar cáncer. Los anticuerpos pueden proporcionarse tal cual o contenidos en una composición.

5 Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo para su uso en el diagnóstico de cáncer.

10 El presente anticuerpo se une a TAG-72 con alta afinidad. Por tanto, la formación del complejo entre TAG-72 y el anticuerpo puede determinarse cuantitativa o cualitativamente midiendo el tamaño de señal de una etiqueta de detección, permitiendo de ese modo el diagnóstico de cáncer. Los ejemplos no limitativos de la etiqueta que permite la medición cuantitativa o cualitativa de la formación de complejos antígeno-anticuerpo incluyen enzimas, sustancias fluorescentes, ligandos, sustancias luminiscentes, micropartículas, moléculas redox e isótopos radiactivos. En la presente invención, la inmunohistoquímica reveló que el presente anticuerpo tiene una reactividad muy fuerte con

15 Además, los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse a un paciente en forma conjugada con un marcador de obtención de imágenes y luego detectarse con el fin de diagnosticar carcinomas humanos o metástasis de los mismos. Puesto que los anticuerpos de la presente invención tienen afinidad mayor por un antígeno que los anticuerpos convencionales y son además anticuerpos humanizados, son muy adecuados para su administración a

20 pacientes. La administración y detección de un conjugado anticuerpo-marcador de obtención de imágenes y un método de conjugación de un anticuerpo a un marcador de obtención de imágenes se describen muchas veces en la bibliografía (Goldenberg *et al.*, 1978, *New England J. Med.* 298, 1384-1388; Goldenberg *et al.*, 1983, *J. Amer. Med. Assoc.* 280, 630-635; Goldengerg *et al.*, 1983, *Gastroenterol.* 84, 524-532; Siccardi *et al.*, 1986, *Cancer Res.* 46, 4817-4822; Epenetos *et al.*, 1985, *Cancer* 55, 984-987; Philben *et al.*, 1986, *Cancer* 57, 571-576; Chiou *et al.*, 1986, *Cancer Inst.* 76, 849-855; Colcher *et al.*, 1983, *Cancer Res.*, 43, 736-742; Colcher, E. *et al.*, *Laboratory Research Methods in Biology and Medicine Immunodiagnosics.* New York, Alan R. Liss. págs. 215-258(1983); Keenan, A.M. *et al.*, 1984, *J. Nucl. Med.* 25, 1197-1203; Colcher D. *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47, 1185-1189; Estaban, J.M. *et al.*, 1987, *Intl. J. Cancer* 39, 50-59; Martin, D.T., *et al.*, 1984, *Curr. Surg.* 41, 193-194; Martin, E.W. Jr. *et al.*, 1986, *Hybridoma* 5, S97- S108; Martin, D.T. *et al.*, 1985, *Am. J. Surg.* 150, 672-675; Meares *et al.*, *Anal. Biochem.* 1984, 142, 68-78; y Krejcarek *et al.*, 1977, *Biochem. y Biophys. Res. Comm.* 77, 581-585). La dosificación puede variar dependiendo de la edad y el peso del paciente. La dosificación del conjugado anticuerpo-marcador de obtención de imágenes debe ser una cantidad que pueda visualizar o detectar eficazmente sitios tumorales distintos de tejidos

35 Los expertos en la técnica conocen bien los ejemplos de marcadores de obtención de imágenes que pueden conjugarse con el anticuerpo, e incluyen sustancias que pueden detectarse mediante detección de imágenes de diagnóstico usando un escáner de rayos gamma, una sonda gamma portátil o tomografía de emisión de positrones y sustancias que pueden detectarse mediante obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear usando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear.

40 Los ejemplos adecuados de sustancias que pueden detectarse usando un escáner de rayos gamma incluyen isótopos radiactivos, tales como ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re y $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Se refieren ^{125}I , ^{123}I , ^{153}Sm y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ porque tienen baja energía y son adecuados para un amplio intervalo de detección. Un ejemplo de una sustancia que puede detectarse usando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear es gadolinio (Gd).

50 Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo para su uso en el tratamiento de cáncer. En comparación con el anticuerpo AKA/HzK convencional, los anticuerpos de la presente invención se mantenían a niveles mayores en ratones atómicos con xenoinjerto con cáncer de colon humano y estaban presentes a altos niveles en la sangre. Cuando los presentes anticuerpos se administraron a ratones atómicos que portaban xenoinjertos de cáncer de colon humano, los ratones sobrevivieron durante un periodo de tiempo mucho mayor en comparación con ratones control.

55 El cáncer que puede tratarse mediante la presente composición incluye todos los tipos de cáncer que expresan TAG-72. Puesto que TAG-72 se expresa en una amplia variedad de carcinomas humanos, la presente composición puede tratar todos los tipos de cáncer que expresan TAG-72. Los ejemplos de tales tipos de cáncer incluyen cáncer de colon, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer pancreático y cáncer de mama.

60 Cuando se usa como anticuerpo terapéutico, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a un agente terapéutico conocido mediante acoplamiento directo o indirecto (por ejemplo, unión covalente) a través de un ligador, y administrarse al organismo en conjugados anticuerpo-agente terapéutico con el fin de tratar cáncer.

65 Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos que pueden unirse al anticuerpo incluyen agentes terapéuticos químicos, radionúclidos, agentes inmunoterápicos, citocinas, quimiocinas, toxinas, agentes biológicos, inhibidores enzimáticos y anticuerpos heterofuncionales: (1) anticuerpos acoplados a radionúclidos, tales como ^{131}I , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{67}Ga , ^{125}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{123}I e ^{111}In , que se describen, por ejemplo, en

Goldengerg *et al.*, 1981, *Cancer Res.* 41, 4354-4360; (2) anticuerpos acoplados a fármacos o modificadores de la respuesta biológica, tales como metotrexato, adriamicina y linfocinas tales como interferón, que se describen, por ejemplo, en Chabner *et al.*, 1985, *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, Filadelfia, PA, J.B. Lippincott Co. Vol. 1, págs. 290-328; (3) anticuerpos acoplados a toxinas tales como ricina, abrina y diftérica, que se describen, por ejemplo, en Uhr *et al.*, 1983, *Monoclonal antibodies and Cancer*, Academic Press, Inc., págs. 85-98; (4) anticuerpos heterofuncionales, es decir, anticuerpos acoplados a otros anticuerpos de modo que los complejos se unen tanto a carcinoma como a células efectoras (por ejemplo, células K (linfocitos citolíticos) tales como células T), que se describen, por ejemplo, en Perez *et al.*, 1986, *J. Exper. Med.* 163, 166-178; y Lau *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82, 8648-8652; y (5) anticuerpos nativos, es decir, anticuerpos no conjugados o no complejados, que se describen, por ejemplo, en Herlyn *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)* 79, 4761-4765.

La composición que comprende el anticuerpo para su uso en el tratamiento de cáncer incluye un portador aceptable y se formula en una forma de dosificación adecuada según modos de administración. Se conocen preparaciones farmacéuticas adecuadas para los modos de administración, y generalmente incluyen tensioactivos que facilitan el transporte a través de la membrana. Tales tensioactivos pueden derivarse de esteroides, o pueden ser lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), o diversos compuestos tales como hemisuccinato de colesterol y fosfatidilglicerol.

La presente composición puede administrarse a un paciente en una cantidad suficiente para tratar cáncer. La dosificación puede variar según una variedad de factores, incluyendo el tipo de cáncer, la edad y el peso del paciente, las propiedades y la gravedad de la enfermedad, los tipos de terapia usada actualmente, la frecuencia de tratamiento y los modos y vías de administración, y puede determinarse fácilmente por especialistas en la técnica. La presente composición puede administrarse o bien simultánea o bien secuencialmente con componentes farmacéuticos o fisiológicos, y también pueden administrarse en combinación con agentes terapéuticos convencionales de manera secuencial o simultánea. La presente composición puede administrarse en una dosificación única o múltiple. Teniendo en cuenta todos estos factores, es importante administrar la composición en una cantidad mínima para lograr efectos máximos sin efectos secundarios, y tal dosificación puede determinarse por los expertos en la técnica.

El término "administración", tal como se usa en el presente documento, significa introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en un paciente mediante un determinado método adecuado. La composición que comprende el anticuerpo de la presente invención puede administrarse a través de cualquiera de las vías comunes, siempre que pueda alcanzar un tejido deseado. Son posibles una variedad de modos de administración, incluyendo vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea, vía intradérmica, vía oral, vía tópica, vía intranasal, vía intrapulmonar y vía intrarrectal, pero la presente invención no se limita a estos modos de administración facilitados a modo de ejemplo. Sin embargo, puesto que las proteínas se digieren tras la administración oral, los componentes activos de una composición para administración oral deben recubrirse o formularse para su protección contra la degradación en el estómago. Además, la composición farmacéutica puede administrarse usando un aparato determinado que pueda transportar los principios activos al interior de una célula diana.

A continuación en el presente documento, se describirá la presente invención en detalle.

En primer lugar, se preparó una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a TAG-72 según la presente invención.

Una región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado AKA/HzK tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 1, y consiste en una FR1 que abarca las posiciones 1 a 30, una CDR1 que abarca las posiciones 31 a 35, una FR2 que abarca las posiciones 36 a 49, una CDR2 que abarca las posiciones 50 a 66, una FR3 que abarca las posiciones 67 a 98, una CDR3 que abarca las posiciones 99 a 104 y una FR4 que abarca las posiciones 105 a 115. Entre ellas, se mutó la CDR3 a otros aminoácidos determinados para construir un anticuerpo novedoso que tienen mayor capacidad de unión a antígeno a TAG-72 que el anticuerpo original AKA/HzK.

En la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado AKA/HzK, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, se mutó al azar la CDR3 dando un residuo de serina (Ser) en la posición 99, un residuo de leucina (Leu) en la posición 100, un residuo de asparagina (Asn) en la posición 101, un residuo de metionina (Met) en la posición 102 y un residuo de alanina (Ala) en la posición 103. En detalle, se llevó a cabo PCR usando como molde un vector de expresión génica pC3-QAKA/HzK para el anticuerpo humanizado AKA/HzK, que se preparó reemplazando el residuo de treonina en la posición 97 de una región variable de cadena pesada de un vector pC3-Q-HzCC49Fab-1-dgIII (n.º de registro de patente coreana 0318761) por alanina, con cebadores que incluyen una secuencia en la que se muta la cadena pesada CDR3 con el fin de obtener fragmentos de ADN que contengan una CDR 3 mutada (figura 1). Se digirieron individualmente los fragmentos de ADN así obtenidos y un vector pC3-Q-AKA/HzK con XhoI y ApaI, se purificaron y se ligaron. Se transformaron las moléculas de ADN ligadas en células competentes de *E. coli* Electro-Ten blue (Stratagene, EE.UU.).

Con el fin de construir un anticuerpo novedoso que tenga afinidad de unión a antígeno potenciada por TAG-72, se

realizó un ensayo de transferencia de colonias tres veces usando *E. coli* que contenía la biblioteca de cadenas pesadas humanizadas (J. Immunol. Met. 272: 219-233, 2003). Se evaluaron los clones aislados mediante exámenes primario, secundario y terciario para determinar si tienen mejor capacidad de unión a antígeno que Fab de AKA/HzK mediante ELISA competitivo usando Fab de AKA/HzK conjugado con biotina. La evaluación de la capacidad de unión a antígeno de los clones seleccionados dio como resultado el hallazgo de que un mutante en el que el residuo de asparagina en la posición 97 está reemplazado por un aminoácido no polar, preferiblemente isoleucina o valina, tiene mejor capacidad de unión a antígeno que AKA/HzK.

Los clones mutantes aislados según el procedimiento anterior se designaron como 3C4, 3D5, 3E8, NV y NI, respectivamente. La secuenciación de ADN de regiones variable de cadena pesada de los clones mutantes reveló que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID Nos. 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente (figura 3).

Con el fin de convertir un anticuerpo en forma de Fab en forma de IgG completa, se insertaron regiones variables de las cadenas pesada y ligera en un vector de expresión para una forma de IgG completa mediante un método de recombinación general. En primer lugar, se unió una secuencia señal de un gen de anticuerpo con una región variable del mutante mediante PCR recombinante. Se insertó el fragmento de ADN resultante en los mismos sitios de restricción de un gen de cadena pesada en un vector de expresión pdCMV-dhfr-AKA/HzK (patente coreana n.º 0318761) para una forma de IgG completa del anticuerpo humanizado AKA/HzK para construir un plásmido que expresa un anticuerpo en forma de IgG completa. Entre los plásmidos de expresión resultantes, se depositó pdCMV-dhfr-3E8 en la KCTC (Colección Coreana de Cultivos Tipo; 52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, Corea) el 21 de junio de 2001 y se le asignó el número de registro KCTC 1039BP.

Se transformaron individualmente los vectores de expresión en células CHO para obtener un transformante. Se subcultivaron las células CHO deficientes en DHFR, se transformaron con el vector de expresión de anticuerpos completos usando Lipofectamine y se seleccionaron en un medio de selección que contenía G418 y otro medio de selección que contenía MTX. Entonces se aislaron los clones de células supervivientes, estableciendo de ese modo líneas celulares transformadas con los presentes vectores que expresan un anticuerpo mutante. Entre ellos, se depositó una línea celular transformada 9E8 transformada con pdCMV-dhfr-3E8 en la KCTC (Colección Coreana de Cultivos Tipo; 52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, Corea) el 21 de junio de 2001 y se le asignó el número de registro KCTC 1040BP.

Se evaluaron los anticuerpos expresados por las líneas celulares transformadas para establecer su afinidad de unión a antígeno para determinar si están disponibles para el diagnóstico y el tratamiento de cáncer. Como resultado, los anticuerpos preparados mediante el presente método tenían todos afinidad enormemente aumentada en comparación con el anticuerpo AKA/HzK convencional. Se encontró que la afinidad de unión a antígeno (K_D) de cada anticuerpo era de $1,45 \times 10^{-8}$ M para el anticuerpo AKA/HzK, $1,33 \times 10^{-9}$ M para el anticuerpo 3C4 completo, $2,27 \times 10^{-9}$ M para el anticuerpo 3D5 completo y $0,65 \times 10^{-9}$ M para el anticuerpo 3E8 completo. Cuando se comparó la afinidad de unión a antígeno de los anticuerpos mutantes de la presente invención con la de AKA/HzK, los presentes anticuerpos tenían los valores de K_D 11, 6 y 22 veces mayores que AKA/HzK, que tenían un valor de K_D de $1,45 \times 10^{-8}$ M. Los valores de K_D de los anticuerpos completos NV y NI eran $1,66 \times 10^{-9}$ M y $3,38 \times 10^{-9}$ M, respectivamente, que eran aproximadamente 8 y 4 veces, respectivamente, mayores que $1,45 \times 10^{-8}$ M de AKA/HzK.

Posteriormente, se reemplazó una cadena ligera humanizada de 3E8 por una cadena ligera humana determinada con el fin de construir un anticuerpo que tenga capacidad de unión a antígeno contra TAG-72 excelente y un riesgo reducido de respuestas inmunitarias en comparación con el anticuerpo 3E8 cuando se administra al organismo. Para esto, se construyó un anticuerpo novedoso reemplazando la región variable de cadena ligera representada por SEQ ID No. 21 por una cadena ligera de anticuerpos humanos.

Se preparó una biblioteca de cadenas ligeras humanas a partir de linfocitos de sangre periférica (PBL) humanos para seleccionar una cadena ligera humana que pueda reemplazar una cadena ligera de los anticuerpos humanizados de la presente invención. En detalle, se aisló ARN total de los PBL humanos y se sintetizó selectivamente ADNc de cadena ligera humana usando el ARN total aislado como molde. Entonces se llevó a cabo PCR usando el ADNc sintetizado como molde con cebadores específicos del extremo 5' para una región variable de cadena ligera kappa humana y un cebador específico del extremo 3' para una región constante de cadena ligera kappa humana para amplificar selectivamente un gen de cadena ligera de anticuerpo humano. Se digirieron individualmente los fragmentos de ADN obtenidos mediante la PCR y un vector pC3-Q-3E8 con SacI y XbaI, se purificaron, se ligaron y se transformaron en células competentes de *E. coli* Electro-Ten blue.

Con el fin de construir un anticuerpo novedoso que tenga afinidad de unión a antígeno potenciada por TAG-72, se realizó un ensayo de transferencia de colonias tres veces usando *E. coli* que contenía la biblioteca de cadenas ligeras humanas. Se evaluaron los clones aislados mediante exámenes primario, secundario y terciario para determinar si tienen mejor capacidad de unión a antígeno que Fab de 3E8 mediante ELISA competitivo usando Fab de 3E8 conjugado con biotina.

Se evaluaron los clones así seleccionados para determinar su capacidad de unión a antígeno para aislar clones que tienen capacidad de unión a antígeno similar a la de Fab de 3E8. La evaluación de anticuerpos Fab purificados a

partir de los clones aislados dio como resultado el hallazgo de que un clon tiene capacidad de unión a antígeno mayor que Fab de 3E8 de la presente invención. Este clon se designó como "pC3-Q-3E8/BSM22". La secuenciación de ADN de la región variable de cadena ligera del clon 3E8/BSM22 reveló que el clon tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 22, que está codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID No. 23.

Con el fin de preparar un anticuerpo humanizado en forma de IgG completa que contenga una región variable de cadena ligera humana, se clonó un gen de región variable de cadena ligera que tenía una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID No. 23 en el sitio clonado de un gen de región variable de cadena ligera de un vector de expresión del anticuerpo humanizado 3E8, pdCMV-dhfr-3E8.

Se introdujo una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción BsiWI en un sitio entre una región variable y una región constante para clonar sólo un gen de región variable en un gen de cadena ligera del vector de expresión pdCMV-dhfr-3E8, produciendo de ese modo un vector de casete pdCMV-dhfrC-3E8. Entonces, a se ligó una secuencia señal de un gen de anticuerpo con una secuencia de región variable de cadena ligera humana, contenida en el vector pC3-Q-3E8/BSM22, mediante PCR recombinante. Se subclonó el ADN ligado en sitios HindIII/BsiWI de pdCMV-dhfrC-3E8 usando las enzimas de restricción HindIII y BsiWI, produciendo de ese modo pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22. Se depositó el plásmido pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22 en la KCTC el 31 de mayo de 2004 y se le asignó el número de registro KCTC 10647BP.

Se introdujo el plásmido de expresión de la presente invención, preparado como anteriormente usando Lipofectamine, en células animales para expresar IgG completa en las células animales.

Se midió la afinidad de unión a antígeno de un anticuerpo expresado por las células animales transformadas mediante ELISA competitivo y se comparó con la del anticuerpo 3E8 de la presente invención. Se encontró que el anticuerpo 3E8/BSM22 tenía mejor capacidad de unión a antígeno que el anticuerpo 3E8 (figura 9). En detalle, el anticuerpo 3E8/BSM22 tenía una K_D de aproximadamente $0,45 \times 10^{-9}$ M, y el anticuerpo 3E8 tenía una K_D de $0,65 \times 10^{-9}$ M. Se encontró que el anticuerpo 3E8/BSM22 tenía una afinidad de unión a antígeno aproximadamente 1,5 veces mayor que el anticuerpo 3E8.

Se transfectó el plásmido de expresión pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22 de la presente invención, preparado tal como se describe, en células CHO deficientes en dhfr, y se seleccionaron en un medio de selección que contenía G418 y otro medio de selección que contenía MTX. Entonces se seleccionaron los clones de células supervivientes, estableciendo de ese modo una línea celular 4D12-B31 transformada con el vector de expresión pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22 de la presente invención. Se depositó la línea celular transformada en la KCTC (Colección Coreana de Cultivos Tipo; 52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, Corea) el 31 de mayo de 2004 y se le asignó el número de registro KCTC 10646BP.

Tal como resulta evidente a partir de los resultados anteriores, los anticuerpos novedosos de la presente invención son anticuerpos humanizados que tienen afinidad de unión a antígeno excelente y un riesgo reducido de respuestas inmunitarias, y por tanto son útiles en el diagnóstico y el tratamiento de cáncer.

Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no pretenden limitar la presente invención.

EJEMPLO 1: Preparación de biblioteca de CDR3 de cadena pesada humanizada de AKA

Se preparó un anticuerpo humanizado novedoso que tenía afinidad de unión a antígeno potenciada en comparación con un anticuerpo humanizado AKA tal como sigue. En primer lugar, se mutó al azar la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 de cadena pesada humanizada del anticuerpo AKA, que está representada por SEQ ID No. 1, en un residuo de serina (Ser) en la posición 99, un residuo de leucina (Leu) en la posición 100, un residuo de asparagina (Asn) en la posición 101, un residuo de metionina (Met) en la posición 102 y un residuo de alanina (Ala) en la posición 103 (figura 1).

En detalle, se llevó a cabo PCR usando como molde un vector de expresión génica pC3-Q-AKA/HzK (n.º de registro de patente coreana 318761) para el anticuerpo humanizado AKA con un par de cebadores VH135 y HCDR3BACK, representados por SEQ ID Nos. 7 y 8, respectivamente, y otro par de cebadores HCDR3FORWARD y LHS11, representados por SEQ ID Nos. 9 y 10, respectivamente. Se llevó a cabo PCR usando Taq ADN polimerasa en condiciones que incluían desnaturalización previa a 95°C durante 3 min y 25 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 50 s, hibridación a 55°C durante 50 s y elongación a 72°C durante 1 min. Se hibridaron un fragmento de ADN de 296 pb, obtenido mediante PCR usando el par de cebadores de VH135 y HCDR3BACK, y otro fragmento de ADN de 180 pb, obtenido mediante PCR usando el par de cebadores de HCDR3FORWARD y LHS11, y se sometieron a PCR recombinante usando los cebadores VH135 y LHS11, produciendo de ese modo un fragmento de ADN de 458 pb. Se llevó a cabo la PCR recombinante usando Taq ADN polimerasa en condiciones que incluían desnaturalización previa a 95°C durante 3 min y 25 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 50 s, hibridación a 55°C durante 50 s y elongación a 72°C durante 1 min. Se digirieron individualmente con XhoI y ApaI un fragmento de

ADN obtenido mediante la PCR recombinante y un vector pC3-Q-AKA/HzK y se purificaron. Se ligaron a 16°C durante la noche los dos fragmentos de ADN digeridos y se incubaron a 70°C durante 10 min para inactivar la ligasa. Entonces, se complementó la mezcla de reacción con 20 µl de glucógeno y 20 µl de acetato de sodio 3 M y luego etanol, y se colocó a -20°C durante la noche para precipitar el ADN. Se lavó el ADN precipitado con etanol al 70%, se secó y se suspendió en 20 µl de agua destilada. Se transformó el ADN ligado así obtenido en células competentes de *E. coli* Electro-Ten blue mediante electroporación. En detalle, se incubaron células Electro-Ten blue con agitación en 500 ml de 2x YT a 37°C hasta que el cultivo alcanzó un valor de DO (densidad óptica) de aproximadamente 0,5 a 0,7, y se colocó en hielo durante 30 min. Se centrifugaron las células a 4000 rpm a 4°C durante 15 min. Tras desecharse el sobrenadante, se suspendió el sedimento celular en 500 ml de glicerol al 10%. Se centrifugó la suspensión celular a 5000 rpm a 4°C durante 15 min. Tras desecharse el sobrenadante, se suspendió el sedimento celular en 250 ml de glicerol al 10% y se centrifugó de nuevo a 5000 rpm a 4°C durante 15 min. Tras desecharse el sobrenadante, se suspendió el sedimento celular en 20 ml de glicerol al 10% y se centrifugó de nuevo a 4000 rpm a 4°C durante 15 min. Tras desecharse el sobrenadante, se suspendió el sedimento celular en 1-2 ml de glicerol al 10%, produciendo de ese modo células competentes. Se añadieron alícuotas de 300 µl de las células competentes a tubos de 1,5 ml y se almacenaron a -70°C.

EJEMPLO 2: Selección de clones mutantes que tienen excelente capacidad de unión a antígeno

Con el fin de encontrar un anticuerpo humanizado novedoso que se uniese específicamente a TAG-72, se examinaron las células de biblioteca preparadas en el ejemplo 1 mediante un ensayo de transferencia de colonias (Radosevic *et al.*, J. Immunol. Methods, 2003, 272(1-2), 219-233) (figura 2).

En primer lugar, se colocó una membrana de nitrocelulosa sobre una placa con 2x YTA, y se realizó un frotis de aproximadamente 1×10^6 células sobre la membrana y se cultivó durante la noche. La membrana se denomina una membrana maestra.

Durante el cultivo por la noche, se recubrió una membrana de captura para encontrar células que tuvieran una fuerte capacidad de unión a antígeno con 10 µg/ml de BSM (mucina submaxilar bovina, tipo I-S, Sigma) positiva para TAG-72, en PBS (solución salina tamponada con fosfato) a 37°C durante 6 h. Se lavó la membrana con PBS dos veces y se incubó en leche desnatada al 5% a 37°C durante 2 h. Tras retirar la leche desnatada, se humedeció la membrana con medio 2X YT complementado con 100 µg/ml de ampicilina e IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) 1 mM. Tras colocar la membrana de captura sobre una placa con 2X YT complementado con 100 µg/ml de ampicilina e IPTG 1 mM, se colocó la membrana maestra sobre la que se había realizado un frotis de células de biblioteca sobre la membrana de captura y se incubó a temperatura ambiente durante 16-24 h.

Se lavó la membrana de captura con Tween 20 al 0,05% que contenía PBS (PBST) cinco veces y se incubó en leche desnatada en PBS a 37°C durante 6 h. Para seleccionar los clones unidos al antígeno BSM, se incubó la membrana de captura en una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-F(ab')₂ humano conjugado con peroxidasa del rábano a 37°C durante 1 h. Se lavó la membrana de captura con PBST aproximadamente cinco veces para eliminar las moléculas de anticuerpo no unidas y se reveló usando el método de ECL para evaluar la capacidad de unión a antígeno de las células.

Se recogieron las células identificadas por tener afinidad de unión por TAG-72 en las mismas posiciones de la membrana maestra y se incubaron en 2X YTA a 37°C hasta que el cultivo alcanzó un valor de DO de aproximadamente 0,7. Se llevó a cabo un ensayo de transferencia de colonias usando las células cultivadas según el mismo procedimiento. Entonces, se realizó ELISA competitivo para determinar si los clones de Fab obtenidos mediante exámenes primario, secundario y terciario tenían una mayor afinidad de unión por TAG-72 que Fab de AKA/HzK de tipo natural.

Para su uso en ELISA competitivo, se incubaron clones de Fab de *E. coli* obtenidos en el tercer examen con agitación a 37°C. Cuando el cultivo alcanzó un valor de DO de 0,5 a 1,0, se trataron las células con IPTG 1 mM a 30°C durante la noche para inducir expresión de Fab. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo. Con el fin de determinar si los anticuerpos Fab tienen excelente capacidad de unión a antígeno en comparación con el Fab de AKA/HzK tipo natural, se recubrió cada pocillo de una placa de ELISA con 1 µg de BSM durante la noche, se bloqueó con BSA al 2% y se lavó con TBS-T tres veces. Se añadieron 25 µl de una dilución 1:2000 de un anticuerpo Fab de AKA/HzK de tipo natural conjugado con biotina (1 mg/ml) y 25 µl de cada uno de los anticuerpos Fab obtenidos a un pocillo, y se incubó la placa a 37°C durante 1 h y se lavó con TBS-T para eliminar las moléculas de anticuerpo no unidas al antígeno. Para determinar la cantidad relativa de Fab de AKA/HzK biotinilado que se une a TAG-72, se añadieron 50 µl de una dilución 1:1000 de estreptavidina-fosfatasa alcalina que puede unirse a biotina a cada pocillo, seguido por incubación a 37°C durante 30 min. Se lavó la placa con TBS-T tres veces para eliminar la estreptavidina-fosfatasa alcalina no unida, y se reveló con 50 µl de una disolución de fosfato de para-nitrofenilo durante al menos 20 min. Entonces se midió la absorbancia a 405-450 nm. En el presente documento, como controles positivos, se usó Fab de AKA/HzK en BSA 5 µg/ml y 10 µg/ml y al 2% solo como control negativo. Como resultado del ELISA competitivo, se seleccionaron los clones mutantes que presentaban valores de ELISA menores que AKA/HzK como control y se estimó su capacidad de unión a antígeno en el siguiente ejemplo 3.

EJEMPLO 3: Evaluación de la capacidad de unión a antígeno de clones mutantes

Con el fin de determinar la capacidad de unión a antígeno de Fab de cada clon seleccionado en el ejemplo 2, se cultivaron los clones mutantes con agitación a 37°C. Cuando el cultivo alcanzó un valor de DO de 0,5 a 1,0, se trataron las células con IPTG 1 mM a 30°C durante la noche para inducir expresión de Fab. Se recogieron las células y se sometieron a choque osmótico usando tampón TES (Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, EDTA 0,5 mM, sacarosa 0,5 M) para obtener un extracto periplásmico en el que se disolvió un anticuerpo Fab mutante.

Con el fin de investigar la especificidad y la capacidad de unión a antígeno del Fab mutante, se recubrió cada pocillo de una placa de ELISA con 1 µg de BSM y 1 µg de BSA durante la noche, se bloqueó con BSA al 2% y se lavó con TBS-T cuatro veces. Se añadió el anticuerpo Fab presente en el extracto periplásmico a cada pocillo y se incubó la placa a 37°C durante 1 h y se lavó con tampón TBS-T para eliminar las moléculas de anticuerpo no unidas al antígeno. Entonces se incubó la placa con un anticuerpo secundario, IgG anti-F(ab')₂ humana-HRP, diluido en TBS-T. Se añadió el sustrato OPD/H₂O₂ a cada pocillo para revelar el color y se midió la absorbancia a 492 nm.

Se aislaron los clones que tenían capacidad de unión a antígeno notablemente potenciada en comparación con el Fab de AKA/HzK de tipo natural. Se determinó una secuencia de nucleótidos de longitud completa de la HCDR3 de cada clon mutante usando un kit de secuenciación de ADN T7 Sequenase V2.0 (Amersham). Se encontró que las secuencias de nucleótidos determinadas codificaban para las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID Nos. 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente (véase, la figura 3). Los mutantes de Fab obtenidos se designaron como 3C4, 3D5, 3E8, NV y NI, respectivamente, y los vectores de expresión de los mismos se designaron como pC3-Q-3C4, pC3-Q-3D5, pC3-Q-3E8, pC3-Q-NV y pC3-Q-NI, respectivamente.

EJEMPLO 4: Construcción de plásmidos de expresión para la expresión de IgG completa de clones humanizados

Con el fin de preparar un anticuerpo en forma de IgG completa usando el mutante de Fab 3E8, se ligaron una secuencia señal de un gen de anticuerpo, una región variable del mutante de Fab y una región constante de anticuerpos humanos mediante PCR recombinante (figura 4).

En detalle, para sintetizar una secuencia señal de un gen de anticuerpo, se llevó a cabo PCR usando como molde un vector de expresión pdCMV-dhfr-AKA/HzK para el anticuerpo humanizado AKA/HzK en forma de IgG completa con un par de cebadores de LHS39 y LHS43, representados por SEQ ID Nos. 11 y 12, respectivamente. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN de 96 pb.

Además, para sintetizar la región 5' de un gen de región variable de cadena pesada del mutante de Fab, se llevó a cabo PCR usando como moldes los vectores pC3-Q-3C4, pC3-Q-3D5, pC3-Q-3E8, pC3-Q-NV y pC3-Q-NI con un par de cebadores de LHS44 y Back tipo C, representados por SEQ ID Nos. 13 y 14, respectivamente. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN de 306 pb. Además, para sintetizar la región 3' del gen de región variable de cadena pesada, se llevó a cabo PCR usando como moldes los vectores pC3-Q-3C4, pC3-Q-3D5, pC3-Q-3E8, pC3-Q-NV y pC3-Q-NI con un par de cebadores de Forward tipo C, como cebador directo y LHS 11, como cebador inverso, representados por SEQ ID Nos. 15 y 10, respectivamente. Se llevó a cabo PCR usando Taq ADN polimerasa en condiciones que incluían desnaturalización previa a 95°C durante 3 min y 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 50 s, hibridación a 55°C durante 50 s y elongación a 72°C durante 1 min. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN de 159 pb. Después, se llevó a cabo PCR usando los tres fragmentos de ADN (96 pb, 306 pb y 159 pb) como moldes con los cebadores LHS11 y LHS39, representados por SEQ ID Nos. 10 y 11, respectivamente, para ligar los tres fragmentos de ADN, produciendo de ese modo un fragmento de ADN de 531 pb. Se digirió el ADN ligado, con EcoRI y ApaI en cada extremo del mismo y se insertó en sitios de EcoRI/ApaI de un vector de expresión animal pdCMV-dhfr-AKA/HzK que porta un gen que codifica para un anticuerpo humanizado AKA/HzK convencional. Los plásmidos de expresión resultantes se designaron como pdCMV-dhfr-3C4, pdCMV-dhfr-3D5, pdCMV-dhfr-3E8, pdCMV-dhfr-NV y pdCMV-dhfr-NI. Entre ellos, el plásmido pdCMV-dhfr-3E8 se depositó en la KCTC (Genetic Resources Center, KRIBB, Corea) y se le asignó el número de registro KCTC 1039BP.

EJEMPLO 5: Determinación de la afinidad de unión a antígeno de anticuerpos humanizados

Con el fin de determinar la capacidad de unión a antígeno y la afinidad de unión a antígeno de los anticuerpos preparados como anteriormente, se introdujeron los plásmidos de expresión de la presente invención, preparados en el ejemplo 4, en células animales para producir anticuerpos IgG completos.

En primer lugar, se subcultivaron células COS7 en medio DMEM (GIBCO) complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% en un incubador del 5% de CO₂ a 37°C. Se sembraron las células en placas de cultivo de 100 mm a una densidad de 1X10⁶ células/ml, se cultivaron a 37°C durante la noche y se lavaron con medio OPTI-MEM I (GIBCO) tres veces. Por separado, se diluyeron 5 µg de cada uno de los vectores de expresión de anticuerpo, pdCMV-dhfr-3C4, pdCMV-dhfr-3D5, pdCMV-dhfr-3E8, pdCMV-dhfr-NV y pdCMVdhfr-NI, preparados en el ejemplo 4, con 500 µl de OPTI-MEM I. También se diluyeron 25 µl de Lipofectamine (GIBCO) con 500 µl de OPTI-MEM I. Se

mezcló el vector de expresión diluido con Lipofectamine diluido en un tubo de 15 ml y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante más de 15 min para formar complejos de ADN-Lipofectamine. Se complementó la mezcla de ADN-Lipofectamine con 5 ml de OPTI-MEM I y se aplicó a las células COS7 lavadas. Se cultivaron las células durante 48 h en un incubador del 5% de CO₂ a 37°C para expresar los anticuerpos 3C4, 3D5, 3E8, NV y NI de la presente invención.

Se midieron mediante ELISA la capacidad de unión a antígeno y la afinidad de unión a antígeno de los anticuerpos 3C4, 3D5, 3E8, NV y NI obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivo celular. En primer lugar, se colocaron 250 ng de BSM en cada pocillo de una inmunoplaaca y se incubó la inmunoplaaca a 4°C durante la noche para permitir que se uniera un antígeno al fondo de la placa. Entonces se bloqueó la inmunoplaaca con BSA al 2% y se lavó con TBS-T cuatro veces. Se diluyeron en PBS los sobrenadantes de cultivo de las células COS7, que contenían los mutantes de IgG completa expresados, y se añadieron a cada pocillo de la placa en la misma concentración. Se incubó la placa a 37°C durante 30 min y se lavó con TBS-T para eliminar las moléculas de anticuerpo no unidas al antígeno. Se hizo reaccionar el anticuerpo primario con un anticuerpo secundario, anticuerpo anti-IgG (específica para Fc) humana-HRP, diluido 1:5000 en TBS-T. Se añadió el sustrato OPD/H₂O₂ a cada pocillo para revelar el color y se midió la absorbancia a 492 nm.

Con el fin de comparar la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo 3E8 con la de AKA/HzK, se llevó a cabo ELISA competitivo. Se mezclaron diversas concentraciones de un antígeno competitivo con concentraciones inferiores a las máximas de los anticuerpos 3C4, 3D5, 3E8, NV, NI o AKA/HzK, y se permitió que reaccionaran a 37°C durante 3 h. Se añadió la mezcla de reacción a cada pocillo de una placa de ELISA cuyos pocillos se recubrieron previamente con 250 ng del antígeno TAG-72. Tras reacción durante 30 min, se incubó la placa en anticuerpo anti-IgG (específica para FC) humana-HRP y se midió el grado de revelado de color.

Se encontró que la afinidad de unión a antígeno (K_D) de los anticuerpos era $1,45 \times 10^{-8}$ M para AKA/HzK, $1,33 \times 10^{-9}$ M para 3C4, $2,27 \times 10^{-9}$ M para 3D5, $0,65 \times 10^{-9}$ M para 3E8, $1,66 \times 10^{-9}$ M para NV y $3,38 \times 10^{-9}$ M para NI. Estos resultados indican que los anticuerpos mutantes respectivamente tienen una afinidad de unión a antígeno potenciada aproximadamente 11, 6, 22, 8 y 4 veces en comparación con AKA/HzK, que tiene un valor de K_D de $1,45 \times 10^{-8}$ M (figura 5a, 5b).

EJEMPLO 6: Establecimiento de la línea celular que expresa el anticuerpo 3E8

Se estableció una línea celular CHO transformada con un vector de expresión del anticuerpo 3E8, pdCMV-dhfr-3E8, para producir el anticuerpo 3E8.

En primer lugar, se subcultivó una línea celular CHO negativa para DHFR, DG44 (ATCC CRL 9096), en medio DMEM que contenía FBS al 10% (GIBCO) en un incubador del 5% de CO₂ a 37°C. Se sembraron las células sobre una placa de cultivo de 100 mm a una densidad de 1×10^6 células/ml, se cultivó a 37°C durante la noche y se lavó con medio OPTI-MEM I (GIBCO) tres veces. Por separado, se diluyeron 5 µg del vector de expresión de anticuerpo pdCMV-dhfr-3E8, preparado en el ejemplo 4, con 500 µl de OPTI-MEM I. También se diluyeron 25 µl de Lipofectamine (GIBCO) con 500 µl de OPTI-MEM I. Se mezcló el vector de expresión diluido con Lipofectamine diluido en un tubo de 15 ml y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante más de 15 min para formar complejos de ADN-Lipofectamine. Se complementó la mezcla de ADN-Lipofectamine con 5 ml de OPTI-MEM I y se aplicó a las células DG44 lavadas. Se cultivaron las células durante 6 h en un incubador del 5% de CO₂ a 37°C, y se complementaron con 3 ml de medio DMEM/F12 que contenía de suero de ternero bovino al 20% y se cultivaron adicionalmente durante 48 h en las mismas condiciones. Se desprendieron las células transformadas con el vector de anticuerpo mutante, se suspendieron en una densidad de 1×10^4 células/ml en un medio de selección, preparado añadiendo FBS dializado al 10% y 550 mg/ml de G418 al medio MEM- α que no contenía nucleótidos, y se añadieron alícuotas a placas de 96 pocillos. Tras un periodo de cultivo de más de una semana, se evaluaron las colonias formadas para determinar la producción de anticuerpos mediante ELISA para seleccionar los clones que expresaban el anticuerpo a altas concentraciones.

Se llevó a cabo ELISA tal como sigue. Se colocaron 100 ng de anticuerpo anti-IgG humana en cada pocillo de una inmunoplaaca y se incubó la inmunoplaaca a 4°C durante la noche. Entonces se bloqueó la inmunoplaaca con BSA al 2% y se lavó con TBS-T cuatro veces. Se diluyeron los sobrenadantes de cultivo en PBS y se añadieron a cada pocillo de la placa. Se incubó la placa a 37°C durante 1 h y se lavó con TBS-T para eliminar las moléculas de anticuerpo no unidas al anticuerpo. Se hizo reaccionar el anticuerpo primario con un anticuerpo secundario, anticuerpo anti-IgG (específica de Fc) humana-HRP, diluido 1:5000 en TBS-T. Se añadió el sustrato OPD/H₂O₂ a cada pocillo para revelar el color y se midió la absorbancia a 492 nm.

Se cultivaron los clones seleccionados que secretaban el anticuerpo 3E8 en altas concentraciones en un medio que contenía MTX 20 nM durante 2 semanas, y luego se cultivaron en un medio de selección que contenía MTX 80 nM. Un clon que expresaba la mayor concentración del anticuerpo 3E8 se designó como "línea celular 9E8", que se depositó en la KCTC (Colección Coreana de Cultivos Tipo; 52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, Corea) el 21 de junio de 2001 y se le asignó el número de registro KCTC 1040BP.

EJEMPLO 7: Purificación de los mutantes de IgG completa y evaluación de su afinidad de unión a antígeno

Se cultivó la línea celular 9E8, preparada en el ejemplo 6, en un medio libre de suero, CHO-S-SFMII (Gibco). Se hizo pasar el sobrenadante de cultivo a través de una columna de proteína G-Sepharose 4B (Pharmacia). Se eluyeron los anticuerpos unidos a la columna con glicina 0,1 M (pH 7,0), se neutralizaron con Tris 1,0 M (pH 9,0) y se dializaron en PBS (pH 7,0). Se sometió el anticuerpo 3E8 purificado a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%.

Tal como se muestra en la figura 6, cuando se separó el anticuerpo en SDS-PAGE en condiciones de reducción, se detectaron dos bandas de proteína a 55 kDa y 25 kDa, que se sabe que son los pesos moleculares de las cadenas pesada y ligera, respectivamente (véase, carril 1). Estos resultados indican que la línea celular 9E8 de la presente invención produce un anticuerpo completo que está en forma tetramérica.

Además, cuando se midió la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo 3E8 purificado según el mismo método que en el ejemplo 5, se encontró que era de aproximadamente $0,65 \times 10^{-9}$ M.

EJEMPLO 8: Preparación de biblioteca de cadenas ligeras humanas

Con el fin de preparar un anticuerpo novedoso que tuviera un menor riesgo de respuestas de HAMA que el anticuerpo humanizado 3E8 y que mantenga la capacidad de unión a antígeno de 3E8, se reemplazó una cadena ligera humanizada del anticuerpo 3E8 por una cadena ligera humana. En primer lugar, se preparó una biblioteca de cadenas ligeras humanas a partir de PBL (linfocitos de sangre periférica) humanos usando un método descrito en Hofman *et al.* (Hofman *et al.*, 1982, Am. J. Clin. Pathol., 77(6):710-713).

En detalle, se aisló el ARN total de los PBL humanos y se sintetizó selectivamente un ADNc de cadena ligera humana usando el ARN total aislado como molde, transcriptasa inversa (Superscript II, Gibco BRL) y un cebador CK1d representado por SEQ ID No. 24. Entonces se llevó a cabo PCR usando el ADNc sintetizado como molde con cebadores específicos de 5' (VK1, VK2, VK3, VK4 y VK5) para una región variable de cadena ligera kappa humana, representados por SEQ ID Nos. 25 a 29, emparejados con un cebador CK1d para amplificar selectivamente un gen de cadena ligera de anticuerpo humano.

Se llevó a cabo PCR usando Taq ADN polimerasa en condiciones que incluían desnaturalización previa a 95°C durante 5 min y 20 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 50 s, hibridación a 55°C durante 50 s y elongación a 72°C durante 1 min. Se determinaron los 20 ciclos de PCR para aumentar la diversidad de anticuerpos humanos.

Se digirieron con SacI y XbaI los fragmentos de ADN de cadena ligera humana obtenidos mediante la PCR, y se insertaron en sitios SacI/XbaI de un vector de expresión para Fab del anticuerpo humanizado 3E8 de la presente invención, pC3-Q-3E8.

En detalle, se digirió el vector pC3-Q-3E8 con SacI y XbaI, se purificó y se ligó con los fragmentos de ADN obtenidos mediante la PCR a 16°C durante la noche, y se incubó a 70°C durante 10 min para inactivar la ligasa. Entonces, se complementó la mezcla de reacción con glucógeno y acetato de sodio 3 M y luego etanol, y se puso a -20°C durante la noche para precipitar el ADN. Se lavó el ADN precipitado con etanol al 70%, se secó y se suspendió en 20 µl de agua destilada. Se transformó el ADN ligado así obtenido en células competentes de *E. coli* Electro-Ten blue mediante electroporación.

EJEMPLO 9: Selección del clon mutante 3E8/BSM22 que tenía fuerte capacidad de unión a antígeno

Con el fin de encontrar un anticuerpo novedoso que se uniera a TAG-72 a partir de las células de biblioteca preparadas en el ejemplo 8, se realizó un ensayo de transferencia de colonias tal como se describe en el ejemplo 2.

Con el fin de determinar si los clones de célula que mostraban capacidad de unión a antígeno tenían una mejor capacidad de unión a antígeno que el Fab de 3E8 de tipo natural, se llevó a cabo ELISA competitivo usando un anticuerpo Fab de 3E8 conjugado con biotina tal como se describe en el ejemplo 2. Como resultado, se obtuvieron clones mutantes que tenían valores de ELISA menores que Fab de 3E8 como control.

Se evaluó cada clon para determinar su capacidad de unión a antígeno tal como se describe en el ejemplo 3. Como resultado, se aislaron clones que tenían una mejor capacidad de unión a antígeno que el Fab de 3E8. Se determinó la secuencia de nucleótidos de una región variable de cadena ligera de cada clon mutante usando un kit de secuenciación de ADN T7 Sequenase V2.0 (Amersham). Se encontró que la secuencia de nucleótidos determinada codificaba para una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 22 (figura 7). El mutante de Fab obtenido se designó como 3E8/BSM22, y un vector de expresión del mismo se designó como pC3-Q-3E8/BSM22.

EJEMPLO 10: Construcción del vector de expresión del anticuerpo 3E8/BSM22 en forma de IgG completa

Con el fin de preparar el anticuerpo 3E8/BSM22 en forma de IgG completa que contenía una cadena ligera humana del anticuerpo 3E8/BSM22, se clonó el gen de cadena ligera humana en el sitio clonado de un gen de cadena ligera

de un vector de expresión del anticuerpo humanizado 3E8 de la presente invención, pdCMV-dhfr-3E8.

En primer lugar, se introdujo una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción BsiWI en un sitio entre una región variable y una región constante para clonar sólo un gen de región variable en un gen de cadena ligera del vector de expresión pdCMV-dhfr-3E8, produciendo de ese modo un vector de casete pdCMV-dhfrC-3E8 (figura 8). En detalle, se llevó a cabo PCR usando pdCMV-dhfr-3E8 como molde con un par de cebadores de LHS42, representado por SEQ ID No. 30, y KCBsiWlback y otro par de cebadores de KCBsiWlfor, representado por SEQ ID No. 32, y CK1d. Se ligaron los dos productos de PCR mediante PCR recombinante usando los cebadores, LHS42, representado por SEQ ID No. 30, y CK1d. Se digirió con HindIII y XbaI el fragmento de ADN resultante y se insertó en el sitio del gen de cadena ligera del vector pdCMV-dhfr-3E8 a la vez que se reemplazaba el gen de cadena ligera, produciendo de ese modo pdCMV-dhfrC-3E8 (figura 8).

Entonces, se ligó una secuencia señal de un gen de cadena ligera con una secuencia de región variable del vector BSM22 mediante PCR recombinante. En detalle, para amplificar una secuencia señal de un gen de anticuerpo, se llevó a cabo PCR usando pdCMVdhfr-AKA/HzK como molde con un par de cebadores de LHS42 y KcleaderBack, representados por SEQ ID Nos. 30 y 33, respectivamente. Además, para amplificar un gen de región variable de cadena ligera humana del Fab, se llevó a cabo PCR usando pC3-Q-3E8/BSM22 como molde con un par de cebadores de KCfor y KCBsiWlback, representados por SEQ ID Nos. 34 y 31, respectivamente. Para ligar la secuencia señal y el gen de región variable de cadena ligera humana, se llevó a cabo PCR recombinante usando los cebadores LHS42 y KCBsiWlback, representados por SEQ ID Nos. 30 y 31, respectivamente. Se llevó a cabo la PCR recombinante usando Taq ADN polimerasa en condiciones que incluían desnaturalización previa a 95°C durante 5 min y 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 50 s, hibridación a 55°C durante 50 s y elongación a 72°C durante 1 min.

Se digirió con HindIII y BsiWI el fragmento de ADN resultante, y se insertó en sitios HindIII/BsiWI del vector de expresión animal pdCMV-dhfrC-3E8, produciendo de ese modo un plásmido de expresión pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22. Se depositó el plásmido pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22 en la KCTC (Colección Coreana de Cultivos Tipo; 52, Oun-dong, Yusongku, Taejon, Corea) el 31 de mayo de 2004 y se le asignó el número de registro KCTC 10647BP.

EJEMPLO 11: Evaluación de la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo 3E8/BSM22

Se determinó la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo 3E8/BSM22 de la presente invención tal como sigue. Se introdujo el plásmido de expresión pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22 de la presente invención en células COS7 tal como se describe en el ejemplo 5 para producir el anticuerpo en forma de IgG completa. Se midió la afinidad de unión a antígeno del anticuerpo 3E8/BSM22 expresado presente en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA competitivo. El anticuerpo 3E8/BSM22 presentó una K_D de aproximadamente $4,5 \times 10^{-10}$ M, y el anticuerpo 3E8 mostró una K_D de aproximadamente 5×10^{-10} M. Por tanto, se encontró que el anticuerpo 3E8/BSM22 tenía una afinidad de unión a antígeno aproximadamente 1,5 veces mayor que el anticuerpo 3E8.

EJEMPLO 12: Establecimiento de la línea celular que expresa el anticuerpo 3E8/BSM22

Se estableció una línea celular CHO transformadas con un vector de expresión pdCMV-dhfr-3E8/BSM22 tal como se describe en el ejemplo 6 para producir el anticuerpo 3E8/BSM22.

Se seleccionó un clon que expresaba el anticuerpo 3E8/BSM22 a altas concentraciones y que mostraba una buena tasa de crecimiento y se designó como "línea celular 4D12-B31", que se depositó en la KCTC (Colección Coreana de Cultivos Tipo; 52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, Corea) el 31 de mayo de 2004 y se le asignó el número de registro KCTC 10646BP.

EJEMPLO 13: Biodistribución y direccionamiento a tumor de los anticuerpos AKA y 3E8

Se evaluaron la distribución *in vivo* y el direccionamiento a tumor de los anticuerpos 3E8 y AKA/HzK en ratones atímicos sometidos a xenoinjerto con cáncer de colon humano. Se marcaron los anticuerpos 3E8 y AKA/HzK purificados con un radioisótopo, ^{125}I . La CCF (cromatografía en capa fina) reveló que los anticuerpos marcados con ^{125}I tienen una pureza radioquímica de más del 99%. Se inyectó por vía intravenosa el anticuerpo 3E8 o AKA/HzK marcado con ^{125}I en el modelo de ratón y se evaluó para determinar su distribución *in vivo* 4, 24, 48 y 72 h tras la inyección del anticuerpo. Se determinó el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% de DI/g de tejido) en tejidos de cáncer y diferenciados, y los resultados se facilitan en la figura 10 y en la tabla 1, más adelante. Tanto AKA/HzK (panel A de la figura 10) y 3E8 (panel B de la figura 10) se dirigieron a cáncer. Se logró la radiactividad máxima en tejidos de cáncer 24 h tras la inyección del anticuerpo. En todos los puntos de tiempo, se conservó 3E8 en tejidos de cáncer a niveles mayores que AKA/HzK. Además, se encontró que ^{125}I -3E8 se conservaba en tejidos de cáncer a altos niveles durante el periodo de prueba, mientras que la acumulación de ^{125}I -AKA/HzK en tejidos de cáncer disminuyó de manera dependiente del tiempo. En comparación con ^{125}I -AKA/HzK, la acumulación de ^{131}I -3E8 en tejidos de cáncer a las 24, 48 y 72 h tras la inyección aumentó hasta aproximadamente el 167%, el 224% y el 236%, respectivamente. Estos resultados indican que 3E8 tiene mayor afinidad por tumores y, por tanto, tiene una

mejor capacidad de unión para tumores que AKA/HzK.

TABLA 1

5 TABLA 1. Biodistribución de ¹²⁵I-AKA y ¹²⁵I-3E8 en ratones atímicos que portan tumores LS174T*

Ac	Órgano	Punto de tiempo (h)			
		4	24	48	72
AKA	Sangre	16,6 ± 1,4	8,0 ± 1,2	4,0 ± 2,9	2,6 ± 0,6
	Hígado	6,5 ± 1,9	3,3 ± 1,2	2,0 ± 0,4	1,2 ± 0,2
	Pulmón	8,4 ± 1,9	4,9 ± 0,5	2,6 ± 1,3	2,1 ± 0,3
	Bazo	12,2 ± 4,6	4,6 ± 1,6	3,6 ± 0,5	2,4 ± 0,2
	Riñón	8,2 ± 0,8	4,3 ± 0,7	1,9 ± 1,2	1,3 ± 0,3
	Músculo	2,2 ± 0,8	2,7 ± 0,5	3,6 ± 0,9	3,8 ± 0,6
	Tumor	4,0 ± 2,0	10,6 ± 2,6	7,7 ± 5,8	7,2 ± 3,3
3E8	Sangre	20,0 ± 0,8	13,6 ± 0,3	8,9 ± 0,5	5,5 ± 3,7
	Hígado	6,3 ± 0,7	4,1 ± 0,1	2,9 ± 0,2	2,3 ± 0,2
	Pulmón	9,5 ± 1,5	6,1 ± 0,5	4,2 ± 1,6	2,9 ± 0,8
	Bazo	6,6 ± 1,2	4,2 ± 0,4	4,2 ± 3,4	3,2 ± 0,6
	Riñón	8,8 ± 0,5	5,6 ± 0,6	3,6 ± 0,2	3,0 ± 0,6
	Músculo	2,2 ± 0,4	3,1 ± 0,4	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,4
	Tumor	7,9 ± 0,9	17,7 ± 3,6	17,3 ± 1,0	17,0 ± 3,6

*Número de microgrupo; n=3, los datos se facilitan como la media ± D.E. Las diferencias en captaciones de tumor entre AKA y BES fueron estadísticamente para todos los puntos de tiempo. (P<0,05).

EJEMPLO 14: Evaluación de la eficacia radioinmunoterápica de 3E8

10 Se sometió a prueba la eficacia terapéutica del anticuerpo 3E8 mediante dos métodos, un ensayo para determinar el efecto inhibitor del anticuerpo sobre el crecimiento tumoral y un ensayo de supervivencia de ratones. En primer lugar, para analizar el efecto inhibitor del anticuerpo sobre el crecimiento tumoral, se inyectó por vía intravenosa ¹³¹I-3E8 (20 mg/7,4 MBq, 200 mCi) a ocho ratones atímicos que portaban xenoinjertos de cáncer de colon humano seis veces (una vez a la semana). Se inyectó a ocho ratones control 3E8 no marcado en lugar de ¹³¹I-3E8. Como resultado, se retrasó el crecimiento tumoral en los ratones a los que se les administró ¹³¹I-3E8 (figura 11). En los ratones tratados, el tiempo de duplicación de tumor (Td) fue de 13,2 días, que era notablemente prolongado en comparación con el Td (5,6 días) de los ratones control (tratados con 3E8 no marcado). No se encontró un gran cambio en el peso corporal en los ratones sometidos a prueba. Es decir, el peso corporal de los ratones control aumentó ligeramente hasta aproximadamente el 102% a medida que pasó el tiempo, y el peso corporal de los ratones tratados disminuyó hasta el 87% del peso corporal inicial.

25 Para estimar las tasas de supervivencia de los ratones tratados con ¹³¹I-3E8, se les administró a siete ratones atímicos 7,4 MBq de ¹³¹I-3E8 cada semana durante un periodo total de 6 semanas. La tasa de supervivencia del 50% de los ratones tratados con ¹³¹I-3E8 se prolongó a un periodo de 90,5 días en comparación con los ratones control, que sobrevivieron durante un periodo de 42,5 días. Por tanto, los ratones tratados tenían una tasa de supervivencia del 50%, 2,1 veces mayor que los ratones control (figura 12). No se encontró un gran cambio en el peso corporal en los ratones sometidos a prueba. Es decir, se encontró un ligero aumento de peso corporal en los ratones control a medida que pasó el tiempo, y los ratones tratados mostraron una disminución de aproximadamente el 10% en el peso corporal.

30 Aplicabilidad industrial

35 Tal como se describió anteriormente en el presente documento, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado que tiene afinidad de unión a antígeno potenciada mutando una cadena pesada de AKA/HzK, y otro anticuerpo humanizado que tiene afinidad de unión a antígeno potenciada reemplazando una cadena ligera del anticuerpo humanizado anterior por una cadena ligera humana. Estos anticuerpos y composiciones contra el cáncer que comprenden los mismos tienen una mayor afinidad de unión por un antígeno TAG-72 que el anticuerpo AKA/HzK convencional y pueden producir un diagnóstico y tratar el cáncer más eficazmente que el anticuerpo humanizado convencional contra TAG-72.

40 <110> Instituto Coreano de Investigación en Biociencia y Biotecnología

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANIZADOS ANTI-TAG-72

45 <160> 34

<170> KopatentIn 1.71

ES 2 561 420 T3

<210> 1
<211> 115
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> región variable de cadena pesada de AKA/HzK

10 <400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

15 <210> 2
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> región variable de cadena pesada de 3C4

25 <400> 2

ES 2 561 420 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Val Gln Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

5 <210> 3
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región variable de cadena pesada de 3D5
<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

15

ES 2 561 420 T3

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ile Gln Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 4

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> región variable de cadena pesada de 3E8

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

ES 2 561 420 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Ile Met Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 115
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> región variable de cadena pesada de NV

<400> 5

ES 2 561 420 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Val Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

- <210> 6
- <211> 115
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> secuencia de aminoácidos de cadena pesada de NI

- <400> 6

ES 2 561 420 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ile Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

5 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador VH135

<400> 7
 aggtgcagct gctcgagtct gg 22

15 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador AKA-HCDR3Back

<400> 8
 tctgcacag taatagaccg ccgtgtc 27

ES 2 561 420 T3

<210> 9
 <211> 54
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador AKA-HCDR3Forward

 10 <400> 9
 gtctattact gtcgaagann snnsnnsnns nnstactggg gccaggcac tctg 54

 <210> 10
 <211> 17
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador LHS11
 20
 <400> 10
 caccggttcg gggaagt 17

 <210> 11
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador LHS 39
 30
 <400> 11
 gacgaattca ctctaaccat ggaa 24

 <210> 12
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador LHS43
 40
 <400> 12
 agactgcaca agctggacct ggga 24
 45
 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador LHS44

 <400> 13
 55 cagctagtgc agtctggggc tgaag 25

 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Back tipo C

 <400> 14
 65 gtactgcatg atccacgatc ttgc 24

ES 2 561 420 T3

<210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador Forward tipo C

 10 <400> 15
 tggatcatgc agtactgggg ccaag 25

 <210> 16
 <211> 345
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 3C4
 20 <400> 16

 cagggccagc tagtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaagggtg 60

 tcctgcaagg ctctggcta caccttcaact gaccatgcaa ttactgggt gcgccaggcc 120

 cctggacaac gccttgagtg gatgggatat tttctcctg gcaacgatga ttttaatac 180
 25 tcccagaagt tccagggacg cgtgacaatc actgcagaca aatccgcgag cacagcctac 240

 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtct attactgtgc aagaagcctg 300

 gtgcaggggt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctca 345

 <210> 17
 <211> 345
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 3D5
 35 <400> 17

ES 2 561 420 T3

caggtccagc tagtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttact gaccatgcaa ttcactgggt gcgccaggcc 120
 cctggacaac gccttgagt gatgggatat ttttctctg gcaacgatga ttttaatac 180
 tcccagaagt tccagggacg cgtgacaatc actgcagaca aatccgcgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggctt attactgtgc aagatcgttg 300
 atccaggggt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctcca 345

5 <210> 18
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 3E8
 <400> 18

caggtccagc tagtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttact gaccatgcaa ttcactgggt gcgccaggcc 120
 cctggacaac gccttgagt gatgggatat ttttctctg gcaacgatga ttttaatac 180
 tcccagaagt tccagggacg cgtgacaatc actgcagaca aatccgcgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggctt attactgtgc aagatcgttg 300
 atcatgcagt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctcca 345

15 <210> 19
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de NV
 <400> 19

ES 2 561 420 T3

caggtccagc tagtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttact gaccatgcaa ttcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacaac gccttgagtg gatgggatat ttttctcctg gcaacgatga ttttaatac 180

tcccagaagt tccagggacg cgtgacaatc actgcagaca aatccgcgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggctct attactgtgc aagaagcctg 300

gtgatggcat actggggcca agggactctg gtcactgtct ctca 345

5 <210> 20
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de NI
 <400> 20

caggtccagc tagtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttact gaccatgcaa ttcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacaac gccttgagtg gatgggatat ttttctcctg gcaacgatga ttttaatac 180

tcccagaagt tccagggacg cgtgacaatc actgcagaca aatccgcgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcggctct attactgtgc aagaagcctg 300

15 atcatggcat actggggcca agggactctg gtcactgtct ctca 345

20 <210> 21
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena ligera de AKA/HzK

25 <400> 21

ES 2 561 420 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

5 <210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(113)
 <223> Región variable de cadena ligera de 3E8/BSM22

15 <400> 22

ES 2 561 420 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile His Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ala Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Asn Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

5 <210> 23
<211> 339
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> alelo
<222> (1)..(339)
<223> Secuencia de ADN que codifica para la región variable de 3E8/BSM22

15 <400> 23

ES 2 561 420 T3

	gacatcgtga tgactcagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc	60
	atccactgca agtccagcca gagtatttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct	120
	tggtatcaac agaaaccagg acagcctccc aagttgctcc tttactgggc atctaccgg	180
	gaagccgggg tccctgaccg tttcagtggc ggcgggtctg ggacagattt cactctcacc	240
	atcagcagcc tgcagcctga agattctgca acttattact gccaacagta taatacttac	300
	ccgctcactt tcggcggagg gaccaagggtg gagatcaaa	339
5	<210> 24 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador CK1d	
15	<400> 24 gcgccgtcta gaattaacac tctcccctgt tgaagctctt tgtgacgggc gaactcag	58
20	<210> 25 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador VK1	
30	<400> 25 gagccgcacg agcccagact ccagatgacc cagtctcc	38
35	<210> 26 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador VK2	
45	<400> 26 gagccgcacg agcccagact cgtgatgacc cagtctcc	38
50	<210> 27 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador VK3	
60	<400> 27 gagccgcacg agcccagact cgtgwtgacv cagtctcc	38
65	<210> 28	

<211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador VK4
 <400> 28
 gagccgcacg agcccgagct cgtgatgact cagtctcc 38
 10 <210> 29
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador VK5
 <400> 29
 20 gagccgcacg agcccgagct cacactcacg cagtctcc 38
 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador LHS42
 30 <400> 30
 tgcaaagctt cggcagcagc a 21
 <210> 31
 <211> 17
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador KCBSiWlback
 40 <400> 31
 gcagccaccg tacgttt 17
 <210> 32
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador KCBSiWlfor
 <400> 32
 tctggtgtg aaggagacac tgtgatgacc cagtctcc 38
 55 <210> 33
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador KCleaderback
 <400> 33
 65 gtctcctca acaccag 17
 <210> 34

ES 2 561 420 T3

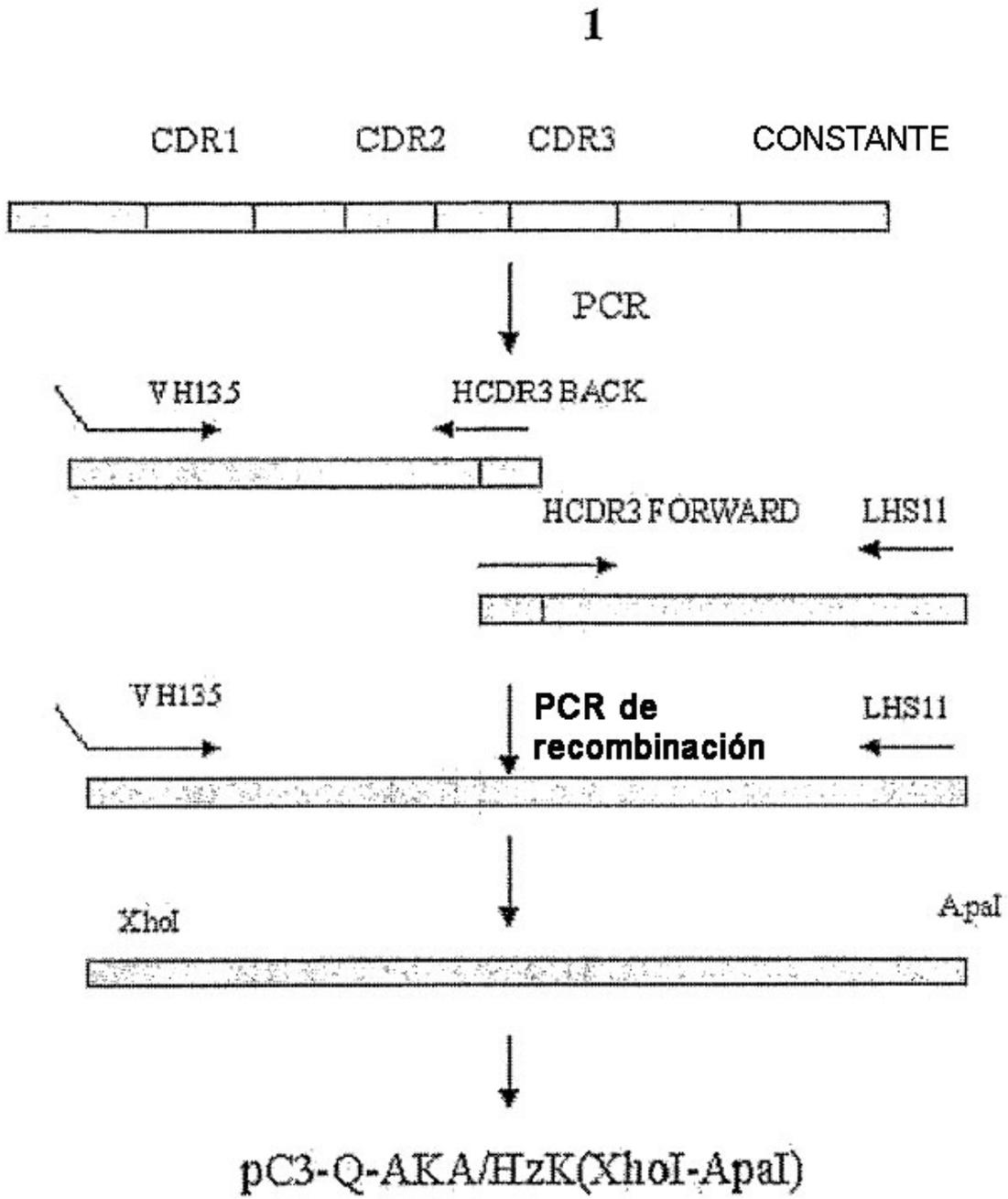
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador KCfor

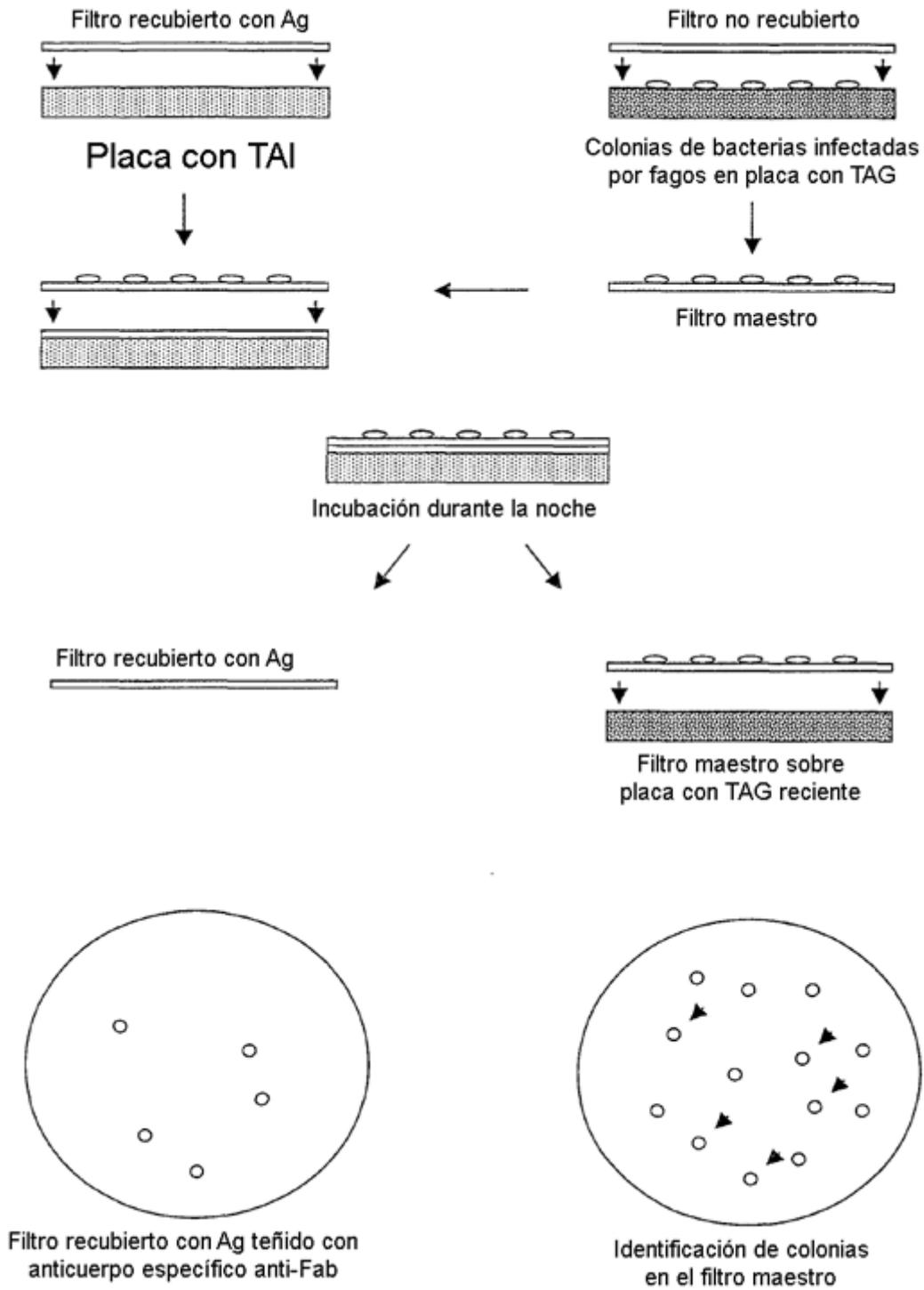
<400> 34
10 tctggtgtg aaggagacat ccagatgacc cagtctcc

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo humanizado contra la glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), que comprende
 - 5 (i) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID Nos. 2 a 6, y
 - 10 (ii) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 21.
2. Anticuerpo humanizado contra la glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), que comprende
 - 15 (i) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 4, y
 - (ii) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No. 22.
3. Vector recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera según la reivindicación 1 ó 2.
4. Vector recombinante según la reivindicación 3, que es un plásmido pdCMV-dhfrC-3E8/BSM22 (KCTC 10647BP).
- 25 5. Transformante transformado con el vector recombinante según la reivindicación 3.
6. Transformante según la reivindicación 5, que está depositado con el número de registro KCTC 1040BP.
7. Transformante según la reivindicación 5, que está depositado con el número de registro KCTC 10646BP.
- 30 8. Método de preparación del anticuerpo humanizado según la reivindicación 1 ó 2, que comprende cultivar el transformante según la reivindicación 5.
9. Composición que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2 y un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 35 10. Composición que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el diagnóstico de cáncer.



2



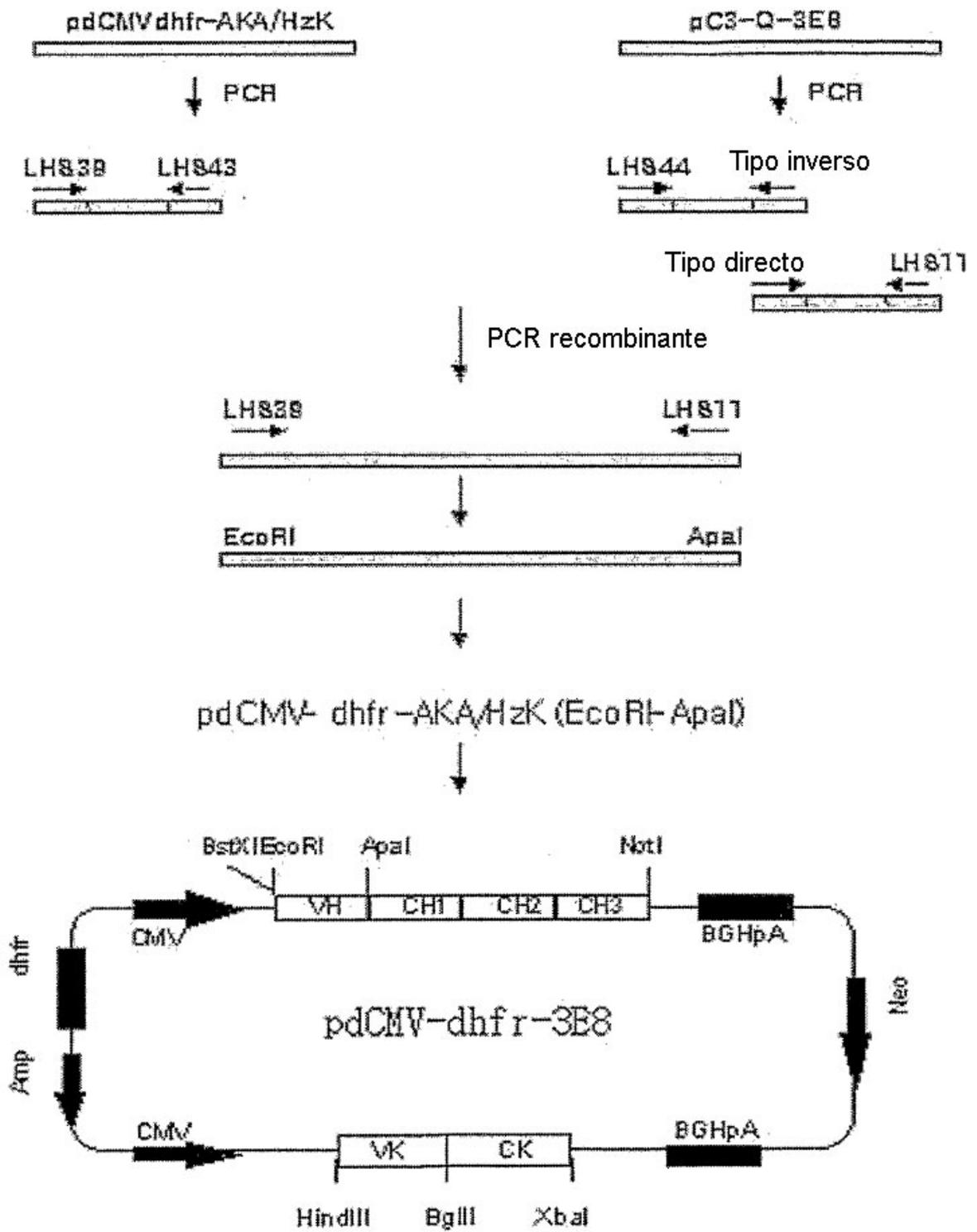
3

	FR1	CDR1
AKA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	DHAIH
3C4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	DHAIH
3D5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	DHAIH
3E8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	DHAIH
NV	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	DHAIH
NI	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	DHAIH

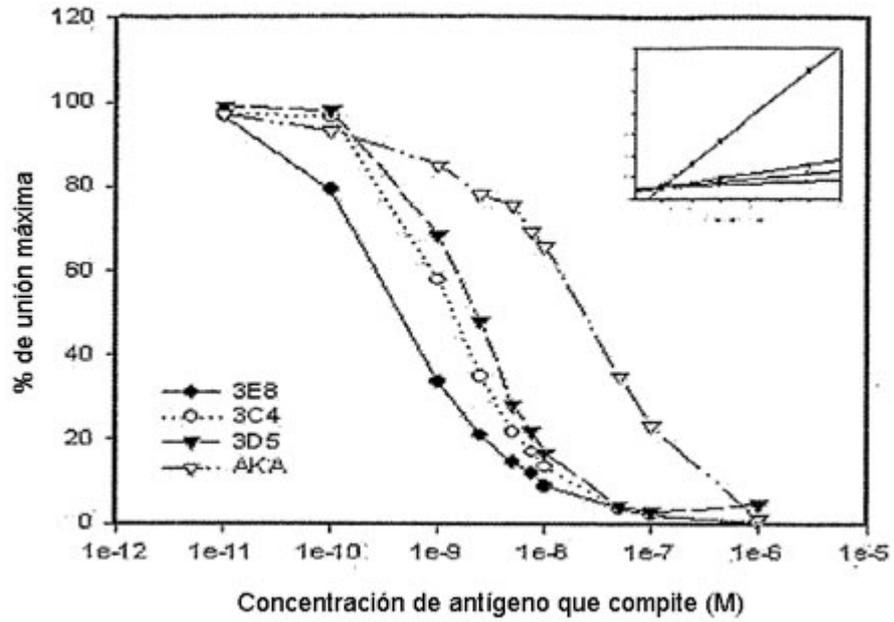
	FR2	CDR2
AKA	WVRQAPGQRLEWMG	YFSPGNDDFKYSQKFQG
3C4	WVRQAPGQRLEWMG	YFSPGNDDFKYSQKFQG
3D5	WVRQAPGQRLEWMG	YFSPGNDDFKYSQKFQG
3E8	WVRQAPGQRLEWMG	YFSPGNDDFKYSQKFQG
NV	WVRQAPGQRLEWMG	YFSPGNDDFKYSQKFQG
NI	WVRQAPGQRLEWMG	YFSPGNDDFKYSQKFQG

	FR3	CDR3	FR4
AKA	RVTITADKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	SLNMAY	WGQGTLVTVSS
3C4	RVTITADKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	SLVQGY	WGQGTLVTVSS
3D5	RVTITADKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	SLIQGY	WGQGTLVTVSS
3E8	RVTITADKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	SWIMQY	WGQGTLVTVSS
NV	RVTITADKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	SLVMAY	WGQGTLVTVSS
NI	RVTITADKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	SLIMAY	WGQGTLVTVSS

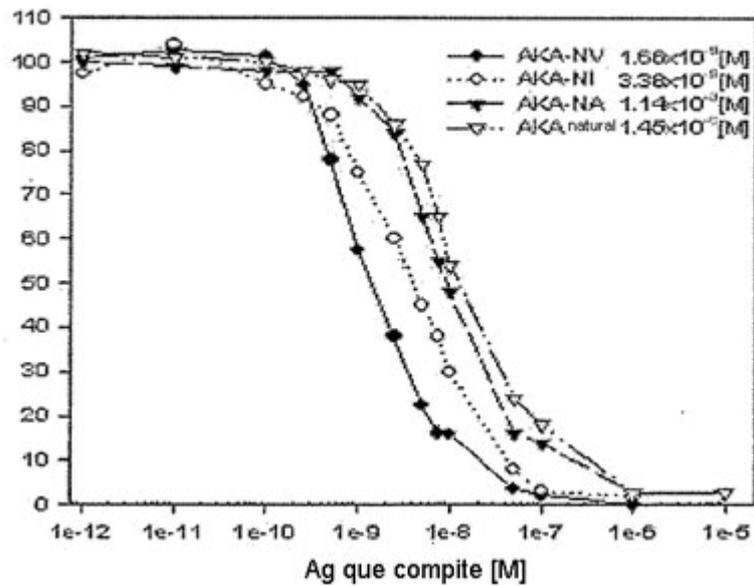
4



5a



5b



6

	1	2
175		
83		
62		
47.5		
32.5		
25		

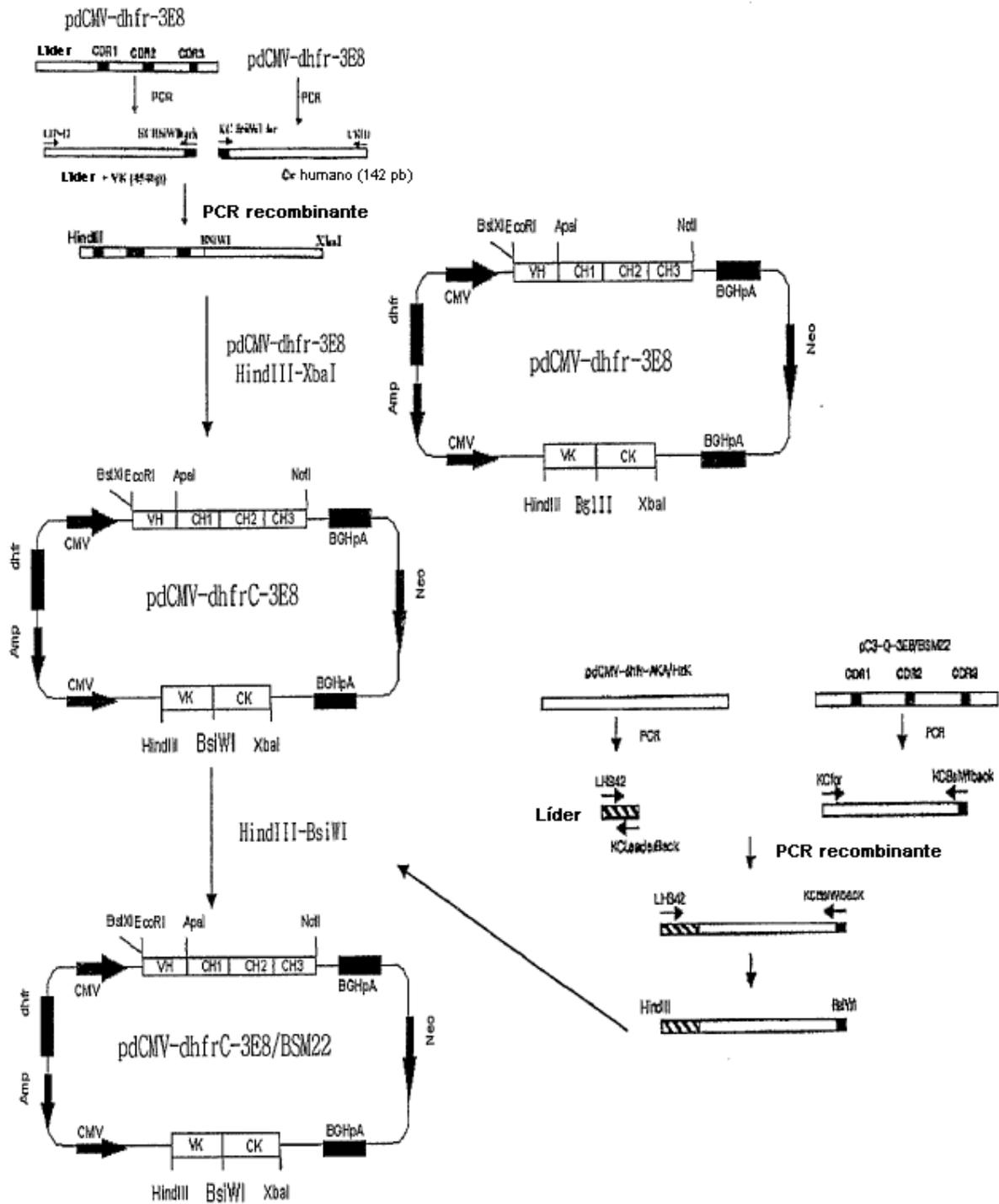
7

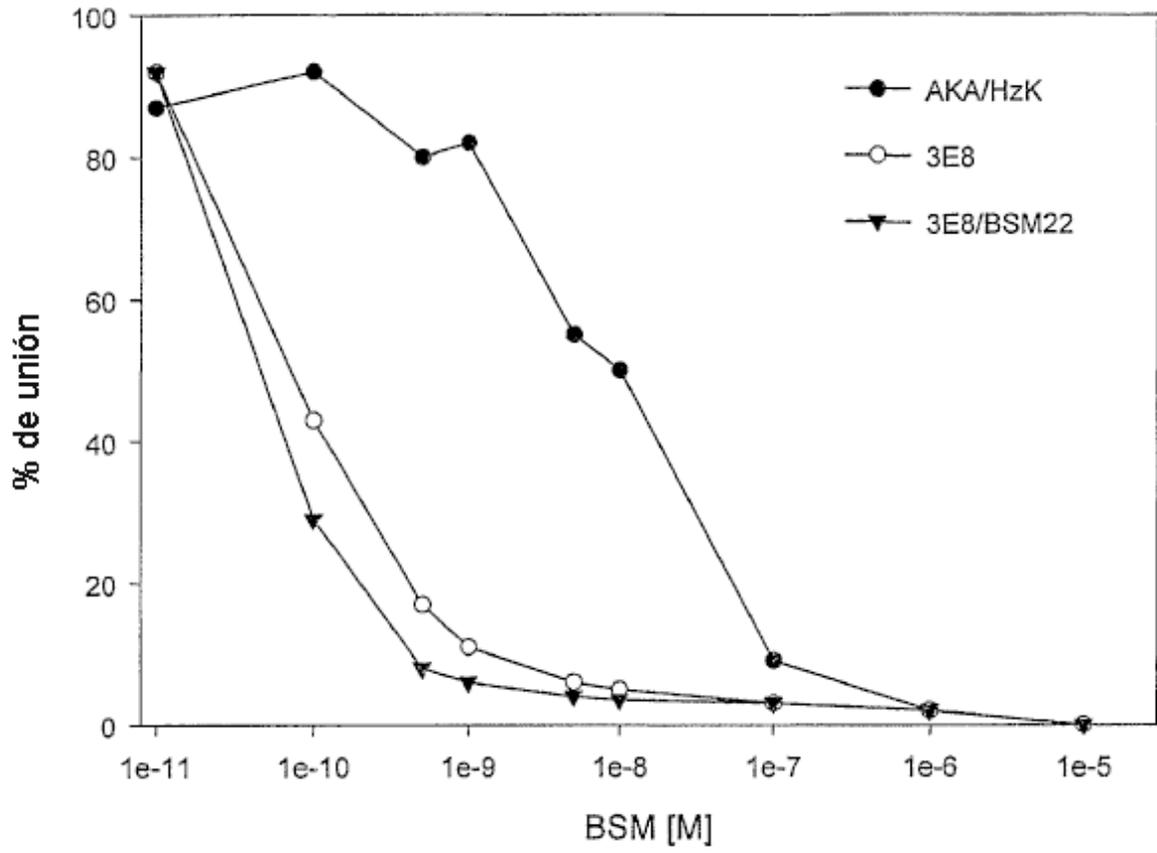
	FR1	CDR1
H ₂ K	DI VMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVLYSSNWKVYLA
BSM22H.I.....

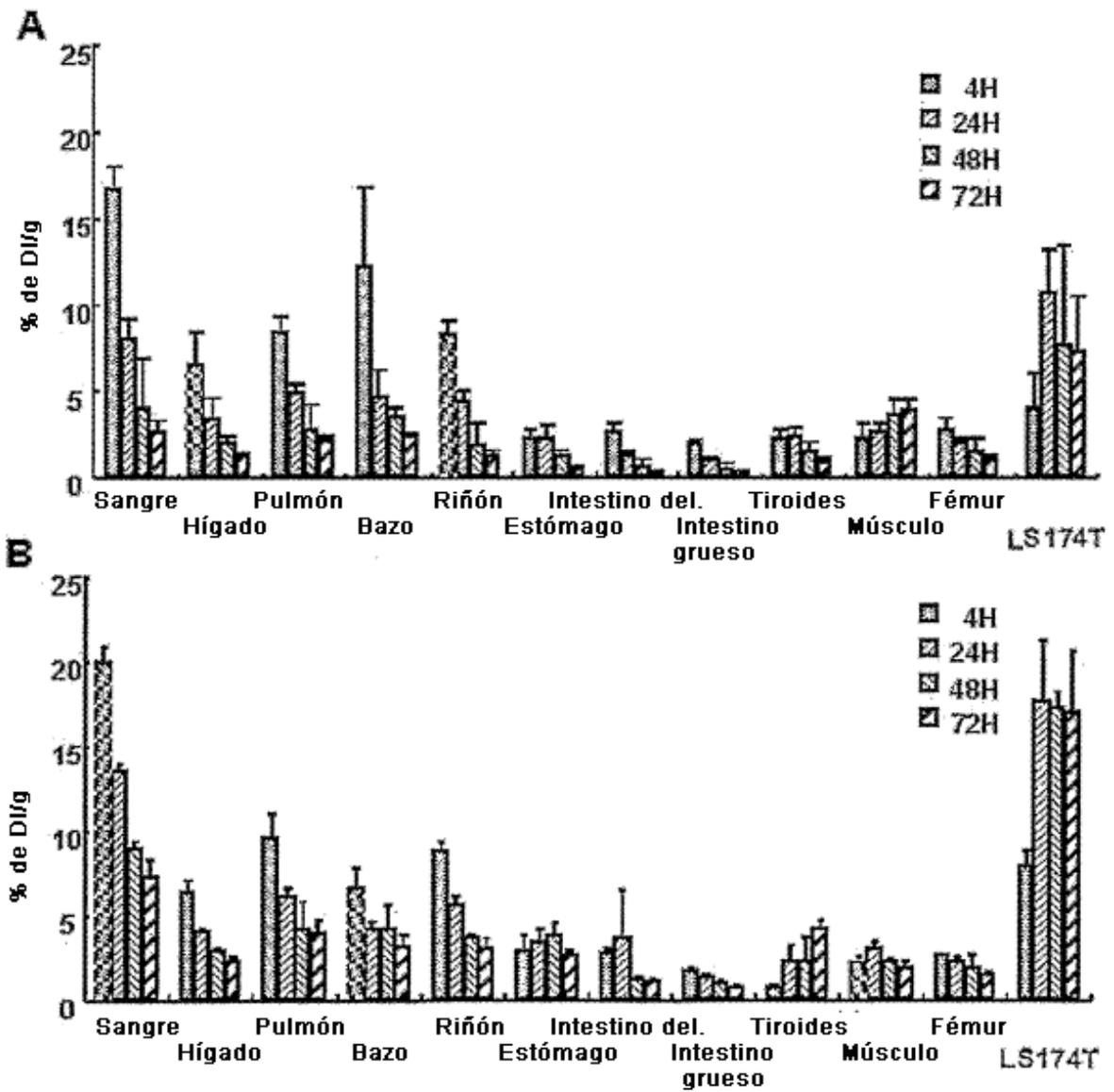
	FR2	CDR2
H ₂ K	WYQQKPGQPPKLLIY	WASTRES
BSM22L.A

	FR3
H ₂ K	GVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYC
BSM22G.....P...S.T...

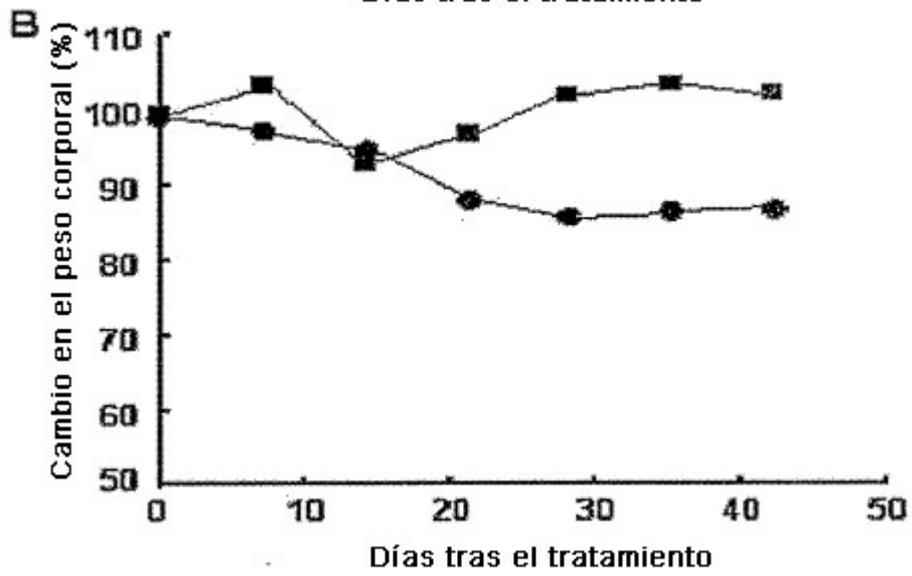
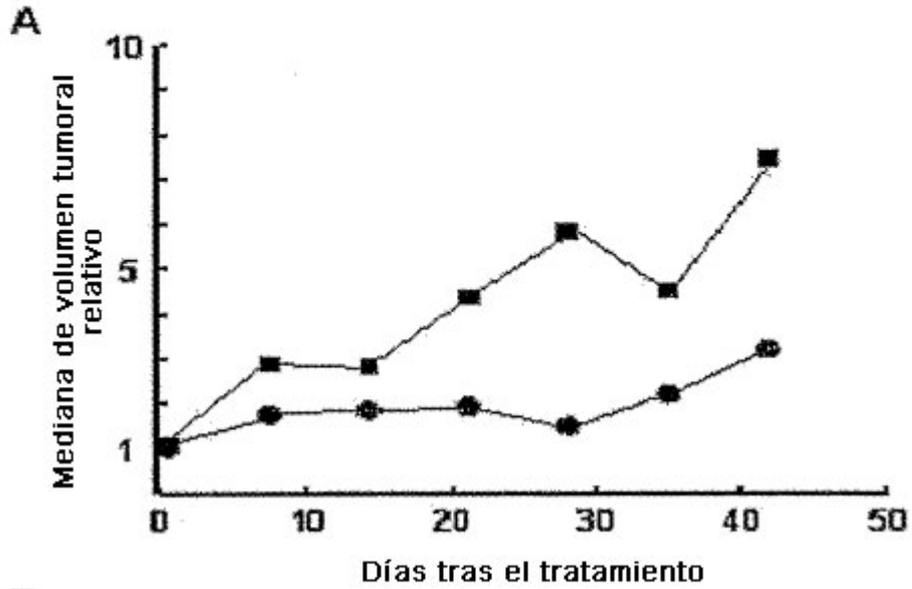
	CDR3	FR4
H ₂ K	QQYYSVPLT	FGGGTKVEIK
BSM22	...NT....







11



12

