

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 998**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**A61K 51/10** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2011 PCT/CN2011/071840**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11137687**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2011 E 11777108 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2567982**

54 Título: **Anticuerpo dirigido contra el antígeno carcinoembrionario y usos del mismo**

30 Prioridad:

**05.05.2010 CN 201010163052**

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

**22.02.2018**

73 Titular/es:

**SHANGHAI HAIKANG PHARMACEUTICAL  
TECH.&DEVE. CO. LTD (100.0%)  
Room 2218, Building No. 6 No. 337, Zhouzhu  
Road  
Shanghai 201318, CN**

72 Inventor/es:

**YANG, ZHIHUA y  
RAN, YULIANG**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 655 998 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo dirigido contra el antígeno carcinoembrionario y usos del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo quimérico humanizado contra el antígeno carcinoembrionario (ACE), a un polinucleótido que codifica el anticuerpo, a un vector de expresión que comprende el polinucleótido y a una célula hospedadora que contiene dicho vector de expresión, así como a su uso en la preparación de un agente o un medicamento para el diagnóstico y/o el tratamiento de tumores.

**Antecedentes**

En 1965, Gold y Fredman de Canadá usaron extracto de cáncer de colon humano para inmunizar conejos y el suero obtenido se usó para examinar diversos tejidos humanos. Se descubrió entonces que los tumores del tubo digestivo originados a partir del endodermo humano son fuertemente positivos para la tinción y también se descubrió que el tejido del tubo digestivo del feto de 2-6 meses de edad también es positivo y, por tanto, dicha molécula de antígeno cuya expresión es positiva en tumores del tubo digestivo se denomina antígeno carcinoembrionario (ACE). Más tarde, se descubrió que la expresión de antígeno ACE en células tumorales diferenciadas a partir de células de endodermo es hasta cientos veces mayor que la de una célula normal y, por tanto, es un antígeno y marcador importante de diversos tumores malignos humanos. Los ACE son glicoproteínas compuestas de una cadena de hidrato de carbono y una cadena peptídica con un peso molecular de aproximadamente 180-200 kD. Debido a las diferencias en la composición y el origen de la cadena de hidrato de carbono, la propiedad bioquímica y la inmunogenicidad de las ACE presentan una gran heterogeneidad, diversidad y no homogeneidad y, por tanto, forman una familia relativamente grande de macromoléculas. La molécula de ACE tiene muchos epítomos antigénicos diferentes y estos epítomos diferentes se expresan de manera diferente en diferentes tejidos normales de adultos, órganos fetales y diversos tejidos tumorales malignos, y las características específicas de los mismos también son diferentes. Hammarstrom et al. propusieron en 1989 que los epítomos antigénicos de ACE pueden dividirse en 5 grupos, es decir, Gold 1-5 (clasificación de Gold). Se indica en estudios que los epítomos antigénicos de los grupos Gold 1-5 se ubican, respectivamente, en los dominios A3, B2, B3, A1 y N de moléculas de ACE, en los que los dominios A3 y B3 tienen una baja homología con otras moléculas relacionadas con ACE y que son dominios relativamente únicos de moléculas de ACE.

El ACE se expresa principalmente en la membrana celular y en el citoplasma de una célula y también se expresa en diversos tejidos de la capa germinal del embrión de 8 semanas de edad. En los tejidos de embriones mayores de 3 meses, el ACE se expresa principalmente en tejidos epiteliales gastrointestinales; mientras que la expresión de ACE en tejidos adultos se reduce o disminuye significativamente, con solo un rastro de expresión en la superficie de células epiteliales de colon. Pero el ACE se expresa altamente en muchos tumores malignos, incluyendo el cáncer colorrectal, el cáncer de estómago, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de páncreas, el cáncer de ovario, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga, el cáncer de vesícula biliar y el cáncer de esófago, con una tasa positiva hasta el 50-90 %. El ACE también se expresa altamente en lesiones metastásicas de estos tumores malignos y los niveles de expresión son más altos que en las lesiones primarias. Entre estos tumores, la expresión de ACE en el cáncer colorrectal es el más alto en términos tanto de tasa positiva (más del 95 %) como de intensidad. El ACE se expresa altamente en casi todos los tejidos de cáncer colorrectal y el nivel de expresión y la tasa positiva de ACE en las lesiones metastásicas, tales como las lesiones metastásicas del hígado, son significativamente mayores que en las lesiones primarias. También se ha demostrado en numerosos estudios que la expresión de ACE en tumores malignos está estrechamente relacionada con la carga, el estadio, la metástasis y el pronóstico de tumores. Por tanto, el ACE ha sido ampliamente reconocido como un marcador molecular específico para tumores malignos, lo que lo hace una de las mejores dianas para la terapia y el diagnóstico de tumores.

Los tumores malignos positivos para el ACE tienen una alta tasa de incidencia, implicando un gran número de pacientes, por lo que son una de las enfermedades más peligrosas para la salud de las personas en el mundo. Por ejemplo, el cáncer de colon con alta expresión de ACE es uno de los tumores malignos que se ven más habitualmente. La tasa de incidencia de cáncer colorrectal en los países desarrollados de Europa y América es la N.º 3 entre todos los tumores malignos y la tasa de mortalidad del mismo está en el número 2. Los casos de nuevo desarrollo en todo el mundo son más de un millón cada año y más de 529.000 pacientes mueren de cáncer colorrectal. Cada año hay cerca de 400.000 pacientes con cáncer colorrectal de nuevo desarrollo en China y cerca de 200.000 pacientes con cáncer colorrectal mueren debido a la resistencia al tratamiento. Hasta ahora, la FDA solo ha aprobado 4 medicamentos quimioterápicos utilizados habitualmente para el cáncer de colon: fluorouracilo, irinotecán, oxaliplatino y capecitabina. Estos medicamentos quimioterápicos y pautas de quimioterapia actualmente disponibles como tratamiento adyuvante postoperatorio pueden reducir la tasa de reaparición de cáncer colorrectal a aproximadamente el 15 % y mejorar y aumentar la tasa de supervivencia a cinco años a aproximadamente el 10-13 %. El medicamento dirigido a anticuerpos es otro tipo de medicamentos nuevos que se han desarrollado durante la última década para el tratamiento de tumores malignos. En el tratamiento clínico de algunos tumores del sistema hemático, tales como el linfoma no Hodgkin, etc., se ha demostrado un efecto terapéutico significativo y se puede

5 aumentar la tasa de supervivencia a cinco años de los pacientes. En cuanto a un agente terapéutico que se dirige a anticuerpos radioactivos usando antígenos ACE como diana, en la actualidad no se ha aprobado ningún medicamento de anticuerpo de ACE para su uso clínico. Pero se han aprobado dos agentes inmunoterápicos radiactivos de anticuerpos de ACE para ensayos clínicos de Fase I y II. Uno de ellos es el medicamento de anticuerpo <sup>131</sup>I-hMN-14, es decir, el anticuerpo anti-ACE humanizado recombinante acoplado a <sup>131</sup>I hMN-14, que se desarrolló en 1999 por Immunomedics Corp. de EE.UU.; y en la actualidad el ensayo clínico de fase II para el tratamiento de la metástasis resistente a fármacos en el cáncer colorrectal avanzado casi ha terminado, y ha entrado en el ensayo clínico de fase III. Otro medicamento de anticuerpo anti-ACE humano es el anticuerpo quimérico de humano/ratón cT84.66 acoplado al nucleido radiactivo <sup>90</sup>Y, que se desarrolla con la aprobación de la FDA por el City of Hope National Medical Center de los EE.UU.; actualmente el ensayo clínico de fase I para el tratamiento de tumores malignos avanzados ha terminado. Sin embargo, los dos medicamentos de anticuerpos de ACE anteriores todavía tienen algunos problemas, tales como que la especificidad necesita mejorarse aún más, los efectos tóxicos y secundarios deben reducirse aún más; la afinidad del anticuerpo es demasiado alta, lo que tiende a provocar la aparición de una barrera de afinidad durante la inmunoterapia radiactiva dirigida y, por tanto, influye significativamente en el efecto terapéutico, etc. Existe una necesidad de un nuevo anticuerpo anti-ACE para superar los problemas de los anticuerpos anti-ACE de la técnica anterior.

20 Lu et al. (*Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, 26 (10), 1259-1264) describe un estudio sobre la distribución de MoAb anti-ACE marcados con [<sup>131</sup>I] y su efecto terapéutico sobre el modelo de cáncer de colon humano en ratones desnudos. En este estudio, se estableció un modelo de ratón desnudo de cáncer de colon humano y se inyectaron MoAb anti-ACE marcados con [<sup>131</sup>I] por vía intravenosa en los ratones. Los autores concluyen que los MoAb anti-ACE marcados con [<sup>131</sup>I] pueden ser eficaces en el RIT en cánceres de colon.

25 Yang et al. (*J. Label Comp. Radiopharm*, 2005, 48, S1-S341) describe un método mejorado para marcar el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE RCH24 con <sup>131</sup>I. Los autores concluyen que el <sup>131</sup>I-RCH24 preparado en el método descrito mostró una buena estabilidad y direccionamiento al tumor.

30 Sato et al. (*Radioimmunotherapy for liver metastases, J. Nucl Med*, 1999, 40:685-692) describe la biodistribución y la distribución intratumoral del anticuerpo monoclonal de ACE radiomarcado en metástasis hepáticas experimentales y el efecto terapéutico del anticuerpo anti-ACE marcado con <sup>131</sup>I. Los autores concluyen que las micrometástasis de menos de 0,5 mm de diámetro mostraron una distribución intratumoral homogénea de anticuerpo inyectado y se trataron satisfactoriamente con anticuerpo marcado con <sup>131</sup>I.

35 Se ha concluido en numerosos estudios anteriores que, la especificidad de unión y la afinidad de un anticuerpo se determinan ambas predominantemente por las secuencias de aminoácidos de las regiones súper variables de cadena ligera y cadena pesada (también denominadas regiones determinantes complementarias y CDR de forma abreviada (del inglés *complementary determinant regions*). La administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) ha afirmado en sus principios instructivos que todos los anticuerpos del mismo tipo que tienen la misma región determinante complementaria pertenecen a un solo anticuerpo. En consecuencia, después de la obtención de la CDR de un anticuerpo que tiene valor terapéutico clínico, las secuencias de aminoácidos de sus regiones no CDR pueden cambiarse fácilmente a través de diversas técnicas establecidas y bien conocidas, con el fin de obtener variantes con actividades biológicas iguales o incluso mejores.

#### 45 Sumario de la invención

La presente invención se basa en un anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental con una especificidad de unión excepcional a ACE y una afinidad apropiada. Las secuencias de las regiones CDR del mismo se han determinado a través de la clonación, la identificación y el análisis de la estructura génica. Se han construido un anticuerpo quimérico humanizado y su vector de expresión de células eucariotas correspondiente y se ha obtenido una cepa de células que expresa y secreta el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE.

55 La presente invención demuestra adicionalmente que, además de una afinidad apropiada que es equivalente a la del anticuerpo monoclonal de ratón parental, dicho anticuerpo quimérico humanizado también tiene una excelente especificidad de unión a ACE y una propiedad de direccionamiento al tumor *in vivo*, y puede inhibir significativamente el crecimiento del cáncer de colon en muchos modelos animales *in vivo*. Puesto que es humanizado, los efectos tóxicos y secundarios del mismo pueden reducirse cuando se aplica a seres humanos. La presente invención adopta adicionalmente modelos animales y experimentos como la inmunoformación de imágenes radiactivas para demostrar suficientemente *in vivo* que dicho anticuerpo quimérico humanizado tiene una excelente propiedad de direccionamiento para tumores positivos para ACE y, por tanto, puede usarse para la preparación *in vivo* de un agente de diagnóstico para tumores positivos para ACE. Además, la presente invención también adopta experimentos como la inmunoterapia radiactiva etc. para demostrar en el cuerpo de varios modelos animales que dicho anticuerpo quimérico humanizado tiene una excelente capacidad para inhibir el crecimiento de tumores positivos para ACE y, por tanto, puede utilizarse en la preparación de un medicamento terapéutico para tumores positivos para ACE.

65 En consecuencia, la presente invención se refiere principalmente a los siguientes aspectos:

En el primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado quimérico monoclonal o a su variante funcional contra el antígeno carcinoembrionario, en el que la cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal comprende regiones CDR como se indican en las SEQ ID NO: 7-9 y la cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal comprende regiones CDR como se establecen en las SEQ ID NO: 10-12.

5 En el segundo aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal quimérico humanizado anti-ACE o su variante funcional, en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal quimérico humanizado anti-ACE es la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 2.

10 También se describe en el presente documento un polipéptido que tiene regiones CDR que son idénticas a las regiones CDR de dicho anticuerpo quimérico humanizado y tiene una actividad biológica que es equivalente o mayor que la actividad biológica de dicho anticuerpo quimérico humanizado. Es bien sabido en la técnica que, tanto la especificidad de unión como la afinidad de un anticuerpo se determinan principalmente por las regiones CDR. Basándose en diversas técnicas de la técnica anterior establecidas y bien conocidas, las secuencias de aminoácidos de regiones no CDR pueden cambiarse fácilmente, con el fin de obtener una variante que tenga una actividad biológica equivalente o superior.

20 En el tercer aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal o su variante de acuerdo con el primer o el segundo aspecto, o que codifica el polipéptido como se describe en el presente documento. Es bien sabido en la técnica que, aunque la secuencia de un ácido nucleico cambie, mientras pueda traducirse finalmente a una proteína de anticuerpo que comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 de acuerdo con el dogma genético del codón triplete, aun así es un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE. Dicho ácido nucleico puede ser ADN o ARN.

25 En el presente documento también se describe un vector de expresión, que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y, preferentemente, el vector de expresión se expresa altamente en una célula eucariota. Preferentemente, dicha célula eucariota es una célula de ovario de hámster chino. Preferentemente, dicho vector de expresión es pSRNC-Ck-CEA como se muestra en la Figura 4 o pSRDC-Cy1-CEA como se muestra en la Figura 5.

30 Se describe adicionalmente una célula hospedadora, que contiene el vector de expresión como se describe en el presente documento. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino (CHO), en particular la célula con el N.º de depósito CGMCC N.º 3803.

35 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de una cantidad terapéutica eficaz de dicho anticuerpo o polipéptido o una variante funcional del mismo (por ejemplo, conjugado, proteína de fusión) de acuerdo con uno de los aspectos 1-2 o como se describe en el presente documento, o de dicho ácido nucleico de acuerdo con el tercer aspecto, o de dicho vector o de dicha célula hospedadora como se describe en el presente documento, en la preparación de un medicamento antitumoral. Dicho tumor se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de vesícula biliar y cáncer de esófago, preferentemente cáncer colorrectal. En una realización preferida, dicho medicamento antitumoral comprende dicho anticuerpo o polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1-2 o como se describe en el presente documento acoplado a un agente radioactivo como principio activo, preferentemente dicho agente radioactivo es <sup>131</sup>I.

40 En el quinto aspecto, la presente invención se refiere al uso de dicho anticuerpo o polipéptido o una variante funcional del mismo (por ejemplo, conjugado, proteína de fusión) de acuerdo con uno de los aspectos 1-2 o como se describe en el presente documento, o de dicho ácido nucleico de acuerdo con el tercer aspecto, o de dicho vector o de dicha célula hospedadora como se describe en el presente documento, en la preparación de un agente de diagnóstico tumoral. Dicho tumor se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de vesícula biliar y cáncer de esófago, preferentemente cáncer colorrectal. En una realización preferida, dicho medicamento de diagnóstico tumoral comprende dicho anticuerpo o polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1-2 o como se describe en el presente documento acoplado a un agente de inmuno-formación de imágenes radiactivo como principio activo, preferentemente dicho agente de inmuno-formación de imágenes radiactivo es <sup>188</sup>Re.

### Descripción de los dibujos

60 La Figura 1 muestra el análisis para el ARN total extraído de la célula de hibridoma del anticuerpo monoclonal de ratón parental usando electroforesis en gel de agarosa. Calle 1. Marcador de peso molecular, ADN  $\lambda$ /Hind III. Calle 2. ARN total de la célula de hibridoma del anticuerpo monoclonal de ratón parental.

65 La Figura 2 muestra el análisis para los productos de la PCR de los genes VL, VH del anticuerpo monoclonal de ratón parental usando electroforesis en gel de agarosa. Calle 1. Marcador de peso molecular, ADN  $\lambda$ /Hind III. Calle 2. Los productos de la PCR del gen VL del anticuerpo monoclonal de ratón parental. Calle 3. Los productos

de la PCR del gen de VH del anticuerpo monoclonal de ratón parental.

La Figura 3 muestra las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) de los genes VL, VH del anticuerpo monoclonal de ratón parental obtenidas mediante amplificación y secuencias de aminoácidos de los mismos (SEQ ID NO: 8), así como secuencias CDR.

La Figura 4 muestra el diagrama esquemático para la estructura del vector de expresión eucariota de la cadena ligera del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE pSRNC-C $\kappa$ -CEA. Pw, promotor eucariota atenuado; Neo, gen de fosfotransferasa de aminoglucósidos (neo); PhCMV-IE, potenciador y promotor inmediato-temprano de citomegalovirus humano; gen VL, el fragmento de gen de la secuencia peptídica líder que lleva la región variable de la cadena ligera y la secuencia del sitio de corte y empalme del extremo del intrón 5'; Gen C $\kappa$ , el fragmento del gen de la región constante de la cadena  $\kappa$  de la cadena ligera del anticuerpo humano; poli A de la BGH, sitio de cola poli A de la hormona del crecimiento bovina; Ap, gen de resistencia a la ampicilina.

La Figura 5 muestra el diagrama esquemático para la estructura del vector de expresión eucariota de la cadena pesada del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE pSRDC-C $\gamma$ 1-CEA. Pw, promotor eucariota atenuado; dhfr, gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr); PhCMV-IE, potenciador y promotor inmediato-temprano de citomegalovirus humano; Gen VH, fragmento de gen de la secuencia peptídica líder que lleva la región variable de la cadena pesada y la secuencia del sitio de corte y empalme del extremo del intrón 5'; gen C $\gamma$ 1, el fragmento del gen de la región constante de la cadena  $\gamma$ 1 de la cadena pesada del anticuerpo humano; BGH poli A de la BGH, sitio de cola poli A de la hormona del crecimiento bovina; Ap, gen de resistencia a la ampicilina.

La Figura 6 muestra los procesos de construcción y detección de la cepa de células que expresa y secreta anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE en nivel alto.

La Figura 7 muestra el contenido de anticuerpo quimérico en el sobrenadante de la cepa de células CHO que expresa y secreta anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE medido usando el método ELISA. En el que, el sobrenadante de CHO (1:1000), DO490 = 1,520, corresponde a 0,08  $\mu$ g/ml, la concentración de la solución madre sobrenadante: 0,08  $\times$  1000 = 80  $\mu$ g/ml.

La Figura 8 muestra la especificidad antigénica del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE analizada mediante PCR-TI. Calle 1. ADN  $\lambda$ /Hind III. Calle 2. Marcador de 320 pb. Calle 3. Producto de amplificación por PCR del gen VL del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE. Calle 4. Producto de amplificación por PCR del gen VH del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE. Calle 5, 6. Control negativo.

La Figura 9 muestra la especificidad antigénica del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE analizada usando inmuno-fluorescencia.

La Figura 10 muestra que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE puede reconocer los antígenos ACE en varias células cancerosas que expresan ACE.

La Figura 11 muestra la propiedad humanizada del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE analizada usando Transferencia de Western. Calle 1. Marcador de peso molecular. Calle 2. Anticuerpo quimérico, Fc-HRP anti-IgG humana como anticuerpo secundario. Calle 3. Anticuerpo monoclonal de ratón, Fc-HRP anti-IgG humana como anticuerpo secundario. Calle 4. Anticuerpo quimérico, anti-cadena  $\kappa$  humana como anticuerpo primario. Calle 5. Anticuerpo monoclonal de ratón, anti-cadena  $\kappa$  humana como anticuerpo primario.

La Figura 12 muestra los resultados del análisis de la captación de la dosis radiactiva expresado como porcentaje por gramo de tejido (% de DI/g) del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE.

La Figura 13 muestra los resultados de la relación de radiactividad del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE entre el tejido tumoral y el tejido normal (T/TN).

La Figura 14 muestra la inmuno-formación de imágenes radiactiva *in vivo* de los tumores de cáncer de colon positivo para ACE mediante el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE.

La Figura 15 muestra los resultados de la terapia del modelo de tumor trasplantado de ratón desnudo que lleva cáncer de colon humano mediante una sola administración del conjugado del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE e I-13 (curva de crecimiento).

La Figura 16 muestra los resultados de la terapia del modelo de tumor trasplantado de ratón desnudo que lleva cáncer de colon humano mediante administraciones múltiples del conjugado del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE e I-13 (curva de crecimiento).

## Descripción detallada

La región variable de anticuerpo del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE de la invención es de un anticuerpo monoclonal anti-ratón C24, que se preparó previamente y se obtuvo mediante la inmunización del ratón usando ACE, y que puede obtenerse a partir de la célula de hibridoma depositada el 4 de mayo de 2010 con el número de depósito CGMCC N.º 3802. Varios estudios anteriores (Lu, Baolan, Cheng, Ming, Qiang, Laiying, et al. "The study for the preparation and immunological characteristics of carcinoembryonic antigen monoclonal antibody". *Chinese Journal of Biotechnology*.1986, 15(2):37) indican que, este anticuerpo monoclonal de ratón tiene unas excelentes propiedades biológicas adecuadas para la terapia dirigida, incluyendo que tiene una especificidad extremadamente alta y una afinidad apropiada. El anticuerpo monoclonal se une al antígeno ACE con una alta especificidad y puede unirse específicamente a varios tumores humanos *in vitro*, incluyendo el cáncer de estómago, el cáncer de pulmón, el cáncer de colon, el cáncer rectal, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de vejiga, etc., pero rara vez se une a células de tejidos humanos normales con una alta especificidad. El análisis de inmunohistoquímica de varios miles de muestras demuestra que el anticuerpo se une a los varios tejidos tumorales mencionados anteriormente con una tasa positiva de hasta el 60 %-90 %, mientras que la tasa positiva para la unión a los tejidos normales es solo de entre el 5 %-10 %. Además, aparte de una alta especificidad, otra ventaja para la terapia

dirigida es que el anticuerpo monoclonal tiene una afinidad apropiada. De acuerdo con la dinámica de unión antígeno-anticuerpo, cuando se usa para la terapia dirigida, el anticuerpo con afinidad demasiado alta dará como resultado el anticuerpo dirigido que se absorbe en la superficie de tumores y que está impedido de penetrar aún más en el interior de los tumores para ejercer un mejor efecto terapéutico. Por tanto, el anticuerpo con una afinidad

5 apropiada es más adecuado para la terapia dirigida del tumor. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE de la invención tiene una afinidad apropiada y la constante de afinidad es de aproximadamente  $1 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ . Se puede esperar que el anticuerpo humanizado del mismo tenga efectos terapéuticos y perspectivas mejores en el tratamiento clínico de los tumores.

## 10 Definición

### Anticuerpo monoclonal

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de un grupo de anticuerpos esencialmente homólogos, es decir, cada uno de los anticuerpos contenidos en el mismo será idéntico excepto porque podrían existir algunos mutantes espontáneos en muy poca cantidad. El anticuerpo monoclonal es un anticuerpo altamente específico contra un único sitio diana. Además, contrariamente a la preparación de anticuerpos convencionales (policlonales) (que contienen normamente diferentes anticuerpos contra diferentes determinantes (epítomos)), cada anticuerpo monoclonal es contra un único determinante en la

15 diana. Además de su especificidad, la ventaja del anticuerpo monoclonal es que puede sintetizarse a través de un cultivo de hibridoma y no puede contaminarse por otras inmunoglobulinas. El adjetivo "monoclonal" se refiere a la característica de que el anticuerpo se obtiene a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogénea, pero no significa que el anticuerpo deba producirse a través de ningún proceso especial. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal utilizado en la presente invención puede aislarse a partir de una biblioteca de anticuerpos de fagos a través de técnicas convencionales. El anticuerpo monoclonal parental utilizado de acuerdo con la presente invención puede producirse a través del método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature* 256.495 (1975) o puede producirse a través de métodos recombinantes.

### Región determinante de la complementariedad (CDR)

Como se usa en el presente documento, la expresión "región determinante de la complementariedad" se refiere a una secuencia en la región variable de moléculas de unión como la inmunoglobulina. Normalmente, proporciona principalmente un sitio de unión a antígeno que es complementario (con respecto a la forma y la distribución de la carga) con el epítipo reconocido en el antígeno. La región CDR puede ser específica para el epítipo lineal, el epítipo individual o el epítipo conformacional de la proteína o el fragmento de proteína. Estos epítomos presentes en la proteína en su conformación nativa o en algunos casos presentes en la proteína en forma desnaturalizada (por ejemplo, mediante solubilización en SDS). El epítipo también puede estar compuesto de proteínas modificadas post-traduccionalmente.

## 40 Polinucleótido

Como se usa en el presente documento, "polinucleótido" incluye un desoxiribo-polinucleótido, un ribo-polinucleótido o un análogo de los mismos que tenga propiedades esenciales del ribonucleótido nativo, siempre que pueda hibridarse (al igual que el nucleótido nativo) con una secuencia de nucleótidos esencialmente idéntica en condiciones rigurosas, y/o pueda traducirse en aminoácidos idénticos justo como el nucleótido nativo. El polinucleótido puede ser una estructura nativa o heterogénea o de longitud completa o una subsecuencia de un gen regulador. A menos que se especifique lo contrario, este término comprende una secuencia específica y una secuencia complementaria de la misma. Por tanto, el término "polinucleótido" como se usa en el presente documento comprende ADN o ARN de la cadena del principio que se ha modificado para la estabilidad o por otras razones.

### Polipéptido

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" puede usarse indistintamente con "péptido" y "proteína", en referencia a polímeros de restos de aminoácidos. Este término se usa para el polímero de aminoácidos, en el que uno o más restos de aminoácidos son análogos artificiales de aminoácidos nativos correspondientes, y se usa para el polímero de aminoácidos nativo. La propiedad esencial de dicho análogo de aminoácido nativo es que, cuando se incorpora en la proteína, la proteína puede reaccionar específicamente con un anticuerpo que es estimulado por una proteína compuesta de aminoácidos idénticos pero totalmente nativos. El término "polipéptido", "péptido" y "proteína" también comprende modificaciones, incluyendo pero no limitadas a la fosforilación, la glucosilación, la unión a lípidos, la sulfuración, la  $\gamma$ -carboxilación de un resto de ácido glutámico, la hidroxilación y la ribosilación de ADP.

### Unión específica

Como se usa en el presente documento, la expresión "unión específica" mencionada en referencia a las

interacciones entre un anticuerpo y su compañero de unión tal como un antígeno, significa que dicha interacción depende de la presencia de una estructura particular en los compañeros de unión, tal como la presencia de determinantes antigénicos o epítomos. En otras palabras, a pesar de que dicho compañero de unión presente en una mezcla de otras moléculas u organismos, dicho anticuerpo aún se une preferentemente o reconoce dicho compañero de unión. Dicha unión puede estar mediada por la interacción covalente o no covalente o por ambas de las dos interacciones. Es decir, la expresión "unión específica" se refiere a la unión inmunespecífica al antígeno o al fragmento del mismo y la unión no inmunespecífica a otros antígenos. La molécula de unión de unión inmunespecífica puede unirse a otro péptido o polipéptido en menor afinidad, como se determina mediante un inmuno-análisis radioactivo (IAR), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), BIACORE o los ensayos conocidos en la técnica. La molécula de unión o fragmento de la misma que se une inmuno-específicamente al antígeno puede reaccionar de forma cruzada con el antígeno relacionado. Preferentemente, la molécula de unión o fragmento de la misma que se une inmuno-específicamente al antígeno no reacciona de forma cruzada con otro antígeno.

#### 15 Variante funcional

Como se usa en el presente documento, la expresión "variante funcional" se refiere a una molécula de unión, que comprende el nucleótido y/o la secuencia de aminoácidos que modifica uno o más nucleótidos y/o aminoácidos en comparación con el nucleótido y/o secuencia de aminoácidos de la molécula de unión parental, pero que aún puede unirse competitivamente al compañero de unión (por ejemplo, ACE) de la molécula de unión parental. En otras palabras, la modificación en la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos de la molécula de unión no afecta o cambia significativamente la propiedad de unión de la molécula de unión que es codificada por dicha secuencia de nucleótidos parental, o que comprende dicha secuencia de aminoácidos, es decir, dicha molécula de unión todavía puede reconocer y unirse a su sitio diana. Dicha variante funcional puede tener una modificación conservadora de la secuencia, incluyendo la sustitución, la adición y la eliminación de nucleótidos o de aminoácidos. Estas modificaciones pueden introducirse mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis aleatoria mediada por PCR, y pueden comprender nucleótidos y aminoácidos nativos y no nativos.

La sustitución de aminoácidos conservadora incluye el reemplazo de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido con estructura o propiedades químicas similares. Se han determinado familias de restos de aminoácidos con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (tales como lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (tales como ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cistina, triptófano), cadenas laterales no polares (tales como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificados en  $\beta$  (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (tales como tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Un experto en la materia sabe que también puede aplicarse una clasificación de familias de restos de aminoácidos distinta de la anterior. Además, una variante puede tener sustitución de aminoácidos no conservadora, tal como la sustitución de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido con estructura o propiedades químicas diferentes. Un cambio pequeño similar también puede incluir la delección o la inserción de aminoácidos, o ambas. Las instrucciones para determinar que un resto de aminoácido puede sustituirse, insertarse o eliminarse sin eliminar las actividades inmunitarias de los mismos pueden descubrirse usando programas informáticos conocidos en la técnica.

Una mutación en una secuencia de nucleótidos puede ser una única mutación (mutación de sitio) generada en un locus del gen, tal como mutación de transición o mutación de transversión, o puede ser una inserción, una delección o un cambio de múltiples nucleótidos en un único locus. Además, pueden generarse uno o más cambios en cualquier número de loci dentro de una secuencia de nucleótidos. Puede realizarse una mutación a través de un método adecuado conocido en la técnica.

#### 50 Anticuerpo quimérico

El método para producir un anticuerpo quimérico puede ser obtenido por un experto en la materia. Por ejemplo, pueden expresarse una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente, en plásmidos separados usando, por ejemplo, una cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada de inmunoglobulina. Después se purifican y se ensamblan *in vitro* como un anticuerpo completo; se ha descrito un método para realizar tal montaje. Véase, por ejemplo, Scharff, M., Harvey *Lectures* 69:125 (1974). Véase también Oi et al., *Bio Techniques* 4(4):214-221 (1986); y Sun et al., *Hybridoma* 5 (1986) Supl. 1:517-20.

También se han descrito los parámetros de reacción *in vitro* para la formación de anticuerpo IgG a partir de cadena ligera y cadena pesada aisladas recuperadas. Véase, por ejemplo, Beychok, S., *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, Nueva York, pág. 69, 1979. También es posible coexpresar la cadena ligera y la cadena pesada en una misma célula con el fin de lograr la asociación intracelular de la cadena ligera y la cadena pesada y después unir las para formar un anticuerpo IgG H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> completo. Dicha coexpresión puede conseguirse usando un mismo o diferentes plásmidos en una misma célula hospedadora.

Anticuerpo humanizado

La forma "humanizada" de un anticuerpo no humano (por ejemplo, de ratón) es una inmunoglobulina quimérica, una cadena de inmunoglobulina o un fragmento de la misma (por ejemplo, fragmento Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo, u otra subsecuencia que se une a la diana) que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Generalmente, un anticuerpo humanizado, al menos uno y por lo general dos, de casi las regiones variables completas, en las que todas o esencialmente todas, las regiones CDR corresponden a las de la inmunoglobulina no humana, y todas, o esencialmente todas, las regiones FR son las regiones de la secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede contener al menos parte de la región constante de inmunoglobulina (Fc), que por lo general es al menos parte de la región constante de inmunoglobulina del molde de inmunoglobulina humana seleccionado.

Vector

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, en la que puede insertarse otro ácido nucleico para introducirlo en una célula hospedadora para replicarse y expresarse, en algunos casos. En otras palabras, un vector puede transferir una molécula de ácido nucleico conectada al mismo. Tanto el vector de clonación como el vector de clonación están abarcados en el término "vector" utilizado en la presente invención. Vector incluye, pero no se limita a, plásmido, cósmido, cromosoma artificial bacteriano (CAB) y cromosoma artificial de levadura (CAL) y vectores derivados de fagos o virus de plantas o animales (incluyendo los seres humanos). Un vector contiene el origen de replicación reconocido por un hospedador dado; en el caso de un vector de expresión, también contiene el promotor y otras regiones reguladoras reconocidas por el hospedador. Un vector que contiene otra molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula a través de transformación, transfección o a través del uso del mecanismo de entrada viral. Algunos vectores pueden replicarse de manera autónoma en la célula hospedadora (por ejemplo, un vector que tiene un origen de replicación bacteriano puede replicarse en bacterias). Pueden integrarse otros vectores en el genoma de un hospedador cuando se introduce en el hospedador y, de este modo, se replican junto con el genoma del hospedador.

Conectado operativamente

La expresión "conectado operativamente" significa que dos o más elementos de ácido nucleico están por lo general conectados a través de una forma física y tienen una relación funcional entre sí. Por ejemplo, si un promotor puede iniciar o regular la transcripción o expresión de la secuencia de codificación, entonces, el promotor y dicha secuencia codificante están conectados operativamente y en el presente documento debe interpretarse que la secuencia de codificación está bajo el "control" del promotor.

Hospedador

Como se usa en el presente documento, el término "hospedador" se refiere a un organismo o una célula, en el que se ha introducido un vector tal como un vector de expresión. Dicho organismo o célula puede ser un organismo o célula procarionota o eucariota. Debe entenderse que este término no solo se refiere a un determinado organismo sujeto o célula, sino que también se refiere a progenies de este organismo o célula. Debido a mutaciones o influencias del medio ambiente, pueden producirse algunas modificaciones en generaciones posteriores y por tanto dichas progenies son en realidad diferentes del organismo o célula parental, pero aún están incluidas en el alcance del término "hospedador" como se usa en el presente documento.

Excipiente farmacéuticamente aceptable

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier agente inerte que se combina con la molécula activa, tal como un medicamento, un agente activo o una molécula de unión, con el fin de preparar una forma de dosificación apropiada o conveniente. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" es un excipiente que no es tóxico para el hospedador en la dosis y la concentración aplicadas y es compatible con otros componentes de la preparación que contiene el medicamento, medicina o molécula de unión.

Cantidad eficaz terapéutica

La expresión "cantidad efectiva terapéutica" significa la cantidad del anticuerpo de la invención que puede prevenir, mejorar y/o tratar el cáncer eficazmente.

Terapia

El término "terapia" se refiere a un tratamiento terapéutico o una medida profiláctica utilizados para curar una enfermedad o para prevenir o al menos retrasar el progreso de una enfermedad. El sujeto que se trata incluye sujetos que padecen cáncer y que necesitan prevención para el cáncer. Un sujeto que se recupera parcialmente o completamente del cáncer también necesita terapia. La prevención incluye la inhibición o la ralentización del progreso del cáncer o la inhibición o la reducción de la aparición, el desarrollo o el progreso de uno o más síntomas

asociados al cáncer.

En la presente descripción, la expresión "que comprende" significa que comprende dicho elemento, número entero o etapa o grupos de elementos, números enteros o etapas, pero sin excluir otro elemento, número entero o etapa u otros grupos de elementos, números enteros o etapas.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado quimérico monoclonal o su variante funcional contra el antígeno carcinoembrionario, en el que la cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal comprende regiones CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 7-9 y la cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal comprende regiones CDR como se establece en las SEQ ID NO: 10-12.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-ACE o su variante funcional, en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cadena ligera del anticuerpo comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cadena pesada comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2. Preferentemente, el anticuerpo anti-ACE es un anticuerpo recombinante o monoclonal. En otra realización preferida, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

En la presente solicitud, la expresión "anticuerpo de la invención" se refiere al anticuerpo monoclonal quimérico humanizado anti-ACE o su variante funcional de acuerdo con la invención, en el que la cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal comprende las regiones CDR como se muestran en las SEQ ID NO: 7-9 y la cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal comprende las regiones CDR como se muestran en las SEQ ID NO: 10-12. Específicamente, la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cadena ligera del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cadena pesada comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2.

También se describe un polipéptido que tiene secuencias de CDR que son idénticas a la de dicho anticuerpo quimérico humanizado y que tiene una actividad biológica que es equivalente o mayor que la actividad biológica de dicho anticuerpo quimérico humanizado de acuerdo con la invención. La expresión "polipéptido de la invención" se refiere a un polipéptido que tiene la secuencias CDR que son idénticas a la de dicho anticuerpo quimérico humanizado, dicho polipéptido tiene una actividad biológica que es equivalente o mayor que la actividad biológica de dicho anticuerpo quimérico humanizado de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere al ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención, que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo o polipéptido de la invención o una secuencia complementaria del mismo. Dicho ácido nucleico puede ser ADN o ARN. Es bien sabido en la técnica que, aunque la secuencia de un ácido nucleico cambie, mientras pueda traducirse finalmente a una proteína de anticuerpo que comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 de acuerdo con el dogma genético del codón triplete, aun así es un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE.

Se describe además un vector de expresión recombinante que puede utilizarse para la preparación de dicho anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE. Dicho vector comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención. Un vector puede derivar de plásmidos tales como F, RI, RP1, Col, pBR322, TOL, Ti, etc.; cósmidos; fagos tales como  $\lambda$ , lambdaoide, M13, Mu, P1, P22, Q, T-par, T-impar, T2, T4, T7, etc.; virus de plantas; o virus animales. Un vector puede utilizarse con fines de clonación y/o expresión y con fines de terapia génica. También se describe un vector que comprende una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de la invención operativamente conectado a una o más moléculas de ácido nucleico reguladoras de la expresión. La selección de un vector depende del procedimiento de recombinación y del hospedador utilizado. La introducción de un vector en una célula hospedadora puede conseguirse a través de la transfección con fosfato de calcio, la infección por virus, la transfección mediada por DEAE-glucano, la transfección por lipofectamina o la electroporación. Un vector puede replicarse de forma autónoma o puede replicarse junto con el cromosoma en el que se ha integrado el vector. Preferentemente, dicho vector contiene uno o más marcadores selectivos. La selección de dicho marcador puede depender de la célula hospedadora seleccionada y no es crítica para la invención y es bien conocida por un experto en la materia. Dicho marcador incluye, pero no se limita a la kanamicina, neomicina, puromicina, higromicina, zeocina, gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), gen de la dihidrofolato reductasa de ratón (dhfr). Específicamente, en la presente invención, los polinucleótidos que codifican la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado quimérico anti-ACE se clonan de forma recombinante en dos vectores que tienen promotor eucariota, respectivamente. Los vectores de expresión obtenidos se introducen en células hospedadoras eucariotas. La célula hospedadora eucariota que expresa el anticuerpo con un alto rendimiento se obtiene a través de la detección y el sobrenadante del cultivo de dicha célula hospedadora contiene una gran cantidad de la proteína de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE segregada por la célula. La proteína de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE puede extraerse y prepararse convenientemente a partir de ella de acuerdo con métodos técnicos conocidos en la técnica. Preferentemente, dichos vectores de expresión son respectivamente pSRNC-Ck-CEA y pSRDC-Cy1-CEA, que contienen genes de dicho anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE y genes marcadores de selección de expresión amplificados por estrés por metotrexato (dhfr), y que pueden expresarse en células de ovario de hámster chino (CHO). Más preferentemente, dicha célula

hospedadora es una célula de ovario de hámster chino CHO.

Se describe además un hospedador que contiene una o más copias de dicho vector. Preferentemente, dicho hospedador es una célula hospedadora. Una célula hospedadora incluye, pero no se limita a células originadas a partir de animales mamíferos, plantas, insectos, hongos o bacterias. Se prefiere un sistema de expresión usando células de mamíferos como la célula de ovario de hámster chino (CHO). Preferentemente se describe una célula hospedadora recombinante (Rcc24), que es una célula de ovario de hámster chino que contiene pSRNC-Ck-CEA y pSRDC-Cy1-ACE. Dicha célula hospedadora recombinante se obtiene a través de: expresión escalonada amplificada por estrés por metotrexato, subclonación de la mancha de expresión alta seleccionada por rendimiento de expresión y, finalmente, aclimatación en cultivo sin suero. Dicha célula hospedadora se depositó en el Centro General de Colección de Cultivos Microbiológicos de China el 4 de mayo de 2010, con el número de depósito CGMCC N.º 3803.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la proteína de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE puede usarse en la preparación de un medicamento para el diagnóstico y/o tratamiento de tumores positivos para ACE humanos. Mediante el acoplamiento de una molécula de rastreo con el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE de la invención, puede prepararse un medicamento para el diagnóstico de tumores positivos para ACE humanos. Dicha molécula de rastreo puede ser un núclido radiactivo (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Te}$  etc.). Como alternativa, también pueden usarse otros tipos de moléculas que puedan ser detectadas por medios técnicos clínicamente aceptables, tal como material de nanofluorescencia o material de infrarrojo lejano etc. En una realización preferida de la invención, la molécula de rastreo es un núclido radiactivo renio-188. Después de que la molécula de rastreo está acoplada al anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE, pueden diagnosticarse tumores positivos para ACE con precisión mediante inmuno-formación de imágenes radiactiva a través de una cámara y o formador de imágenes, con una relación señal-ruido, una propiedad de direccionamiento y una calidad de imagen relativamente buenas.

El anticuerpo de la invención también puede usarse en la preparación de la composición farmacéutica para el tratamiento de tumores. Además, algunos agentes terapéuticos tales como un núclido radiactivo pueden acoplarse al anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE, para preparar la composición farmacéutica para el tratamiento de tumores positivos para ACE humanos. El "conjugado de anticuerpo" como se describe en el presente documento se refiere a un conjugado que se obtiene mediante el acoplamiento de una sustancia terapéutica, tal como un núclido radiactivo, con el anticuerpo de la invención a través de diversos métodos de acoplamiento conocidos por un experto en la materia. Dicho núclido radiactivo incluye  $^{131}\text{I}$  e  $^{90}\text{Y}$ . En una realización preferida de la invención, dicha sustancia terapéutica es un núclido radiactivo yodo-131. Después de que se acopla al anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE, puede realizarse la inmunoterapia radiactiva para los tumores positivos para ACE, que puede inhibir significativamente el crecimiento de tumores y tiene un excelente efecto terapéutico y, esencialmente, no tiene efectos tóxicos y secundarios aparentes. En una realización preferida, el anticuerpo o conjugado de anticuerpo puede usarse para diagnosticar o tratar tumores que expresan ACE, incluyendo el cáncer de ovario, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón y otros tumores positivos para ACE. En una realización específica preferida, dicho tumor que expresa ACE es el cáncer colorrectal. Basándose en técnicas de diagnóstico clínico existentes, un experto en la materia puede detectar el contenido de ACE en el suero del paciente y determinar si el tumor del paciente es positivo para ACE y puede elegir fácilmente el tipo de tumor apropiado que se ha de tratar. Un experto en la materia también debería comprender que la composición farmacéutica mencionada anteriormente también puede contener un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Dicho anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE puede administrarse a los pacientes como un medicamento a través de vías de administración convencionales, incluyendo, pero no limitadas a la administración parenteral, tal como la transvenosa, la infusión, la administración tópica. etc. La dosis apropiada depende de varios parámetros, incluyendo el método para la administración y el sujeto que se trata y el nivel de tolerancia. Es evidente que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE marcado con  $^{131}\text{I}$  puede inhibir significativamente el crecimiento de cáncer colorrectal humano de una manera dependiente de la dosis. La dosis preferida es de 12,5 mCi/kg y el tratamiento se realizará dos veces con un intervalo de diez días.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, pero no debe interpretarse ningún ejemplo o combinación de los mismos como una limitación para el alcance o la realización de la invención. El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Basándose en la presente descripción en combinación con el conocimiento común en la técnica, un experto en la materia puede entender claramente del alcance definido por las reivindicaciones.

#### La información de depósito de materiales biológicos

La estirpe celular de hibridoma de ratón C24 que produce el anticuerpo monoclonal de ratón parental se depositó en el Centro General de Colección de Cultivos Microbiológicos de China (CGMCC, Datun Road, en el distrito Chaoyang de Pekín, el Instituto de Microbiología, Academia China de Ciencias) el 4 de mayo de 2010, con el número de depósito CGMCC N.º 3802.

La estirpe celular de CHO Rcc24 que produce anticuerpo monoclonal quimérico humanizado se depositó en el el

Centro General de Colección de Cultivos Microbiológicos de China (CGMCC, Datun Road, en el distrito Chaoyang de Pekín, el Instituto de Microbiología, Academia China de Ciencias) el 4 de mayo de 2010, con el número de depósito CGMCC N.º 3803.

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1: La clonación y secuenciación de genes para el anticuerpo quimérico

10 Usando el método de clonación de genes, los genes de las regiones variables de cadena ligera y pesada en el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental se clonaron y se realizó el análisis de secuencia de nucleótidos.

Método para la amplificación de los genes de las regiones variables del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental: Se realizó la extracción del ARN total de célula de hibridoma de anticuerpo monoclonal de ratón C24 como se indica a continuación de acuerdo con las instrucciones del reactivo Trizol (Gibco). Se recogieron  $1 \times 10^7$  células de hibridoma de anticuerpo monoclonal de ratón y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 1 min. Después de pipetear y desechar el sobrenadante, se añadió 1 ml de Trizol para lisar suficientemente las células. Después de que se mantuviera quieto a temperatura ambiente durante 3-5 minutos, se añadieron 0,2 ml de cloroformo. Después de invertir y mezclar, la muestra se centrifugó a 4 °C 12000 rpm durante 10 min, después, aproximadamente 0,6 ml del sobrenadante se transfirieron a un nuevo tubo de centrífuga y se añadieron 0,5 ml de isopropanol. Después de 15 invertir y mezclar, la muestra se mantuvo quieta a temperatura ambiente durante 5-10 min y después se centrifugó a 4 °C 12000 rpm durante 10 min. Después de desechar el sobrenadante, la muestra se lavó una vez con etanol al 75 %, se secó al aire y después se añadieron 50 µl de ddH<sub>2</sub>O para disolver el precipitado. La síntesis de la primera cadena de ADNc de célula de hibridoma de anticuerpo monoclonal de ratón se realizó usando MMLV-transcriptasa inversa (Gibco) de acuerdo con la instrucción proporcionada por el fabricante. Se añadieron 4 µl de tampón 5x, DDT 20 10 mM (Promega), 10 µg de RNA total, dNTP a la concentración final de 0,5 mM (Promega), Oligo d(T) 15 a la concentración final de 10 µg/ml (Promega), 40 U de RNasin (Promega), 200 u(U) de MMLV-transcriptasa inversa (Gibco) en un sistema de 20 µl, que después se mezcló. La muestra se incubó a 37 °C durante 1 h y después en agua hirviendo durante 5 min para desactivar la transcriptasa inversa. La amplificación de los genes de las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón se realizó usando ADN 30 polimerasa de alta fidelidad Taq (Promega) + ADN polimerasa Pfu (Promega) en un sistema de reacción de 100 µl que contenía 10 µl de tampón 10x, 2 µl de dNTP 10 mM, 20 µl de ADNc, 50 pmol de cada uno de los cebadores de amplificación. La superficie del sistema de reacción se cubrió con aceite de parafina después de la mezcla. Después se incubó en un baño de agua a 95 °C durante 5 min, se añadieron 1-2 u de ADN polimerasa Taq + Pfu a través del aceite de parafina y se inició el siguiente ciclo: 30 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 35 1 min y 72 °C durante 10 min en el último ciclo. Cebadores de PCR: cebadores para la amplificación de la región variable de la cadena ligera: PVL5: 5'-GACAT TCAGC TGACC CAGTC TCCA-3' (SEQ ID NO: 3); PVL3: 5'-GTTAG ATCTC CAGCT TGGTC CC-3' (SEQ ID NO: 4). Cebadores para la amplificación de la región variable de la cadena pesada: PVH5: 5'-AGGTS MARCT GCAGS AGTCW GG-3' (S=C/G, M=A/C, R=A/G, W=A/T) (SEQ ID NO: 5); PVH3: 5'-TGAGG AGACG GTGAC CGTGG TCCCT TGGCC CCAG-3' (SEQ ID NO: 6).

40 Se realizó una electroforesis en gel de agarosa no desnaturalizante al 0,7 % para analizar el ARN total. Los tamaños del ARN 18S y el ARN 28S eran correctos, la relación de brillo fue de aproximadamente 1:2 y las bandas eran distintas, lo que indicaba que el ARN total extraído estaba relativamente completo (Figura 1). Se usó Oligo d(T) 15 como cebador para sintetizar la primera cadena de ADNc y se utilizó este ADNc como molde para realizar la PCR. 45 Mediante el uso de los cebadores de cadena ligera PVL5 y PVL3, se amplificó un fragmento del gen de la región variable de la cadena ligera de aproximadamente 320 pb; y mediante el uso de cebadores de cadena pesada pVH5 y PVH3, se amplificó un fragmento del gen de la región variable de la cadena pesada de aproximadamente 360 pb. El control blanco sin molde no mostró ninguna banda amplificada (Figura 2). Los tamaños de los fragmentos de genes de la región variable amplificada estaban en conformidad con los tamaños de los genes 50 de la región variable de los anticuerpos normales.

La clonación, la secuenciación y el análisis de la estructura génica de los genes de la región variable de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental: Los fragmentos de genes de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental se amplificaron en una alta 55 cantidad. Después del aislamiento y la recuperación mediante el método de adsorción Glass Milk, los fragmentos se sometieron a doble digestión por Pvu II y Bgl II y, después, se clonaron en el sitio correspondiente del vector de clonación pRGWL. De entre todos los 153 clones transformados, se seleccionaron 24 clones aleatoriamente para la selección y se obtuvieron 6 clones recombinantes. Se seleccionaron tres clones recombinantes de genes de VL para el análisis de secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida se muestran en la Figura 3. Las secuencias de los 3 clones eran idénticas, lo que indica que los genes de la región 60 variable de la cadena ligera del anticuerpo clonado eran de verdad los genes de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental. Se escogió un clon aleatoriamente de entre los tres clones y se nombró pRGWH-C502. Se puede observar a partir de la comparación con los datos de Kabat que, VL (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental pertenece al subgrupo VI de cadenas ligeras k de ratón. Se muestran secuencias CDR1-3 de cadena ligera (SEQ ID NO: 10-12) en la Figura 3. Los fragmentos de genes de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental se 65

amplificaron en una alta cantidad. Después del aislamiento y la recuperación mediante el método de adsorción Glass Milk, los fragmentos se sometieron a doble digestión por Pst I y BstE II y, después, se clonaron en el sitio correspondiente del vector de clonación pRGWH. De entre todos los 364 clones transformados, se seleccionaron 24 clones aleatoriamente para la selección y se obtuvieron 18 clones recombinantes. Se seleccionaron tres clones recombinantes de genes de VH para el análisis de secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida se muestran en la Figura 3. Las secuencias de los 3 clones eran idénticas, lo que indica que los genes de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo clonado eran de verdad los genes de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental. Se escogió un clon aleatoriamente de entre los tres clones y se nombró pRGWL-C504. Se puede observar a partir de la comparación con los datos de Kabat que, VH (SEQ ID NO: 1) del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental pertenece al subgrupo II(B) de cadenas pesadas de ratón. Se muestran secuencias CDR1-3 de cadena pesada (SEQ ID NO: 7-9) en la Figura 3. Específicamente, las secuencias de las SEQ ID NO: 7-12 son:

SEQ ID NO: 7 - His Tyr Tyr Met His

SEQ ID NO: 8 - Trp Ile Asn Pro Glu Asn Val Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly

SEQ ID NO: 9 - Tyr Arg Tyr Ala Gly Gly Gly Ala Leu Asp Tyr

SEQ ID NO: 10 - Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His

SEQ ID NO: 11 - Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

SEQ ID NO: 12 - Gln Gln Trp Asn Asn Asn Pro Tyr Ser

### **Ejemplo 2: La construcción de los genes y vectores de expresión para el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE**

Mediante el uso de métodos de clonación de genes y recombinación del ADN, los genes de la región variable del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental se recombinaron en un vector que contenía secuencias reguladoras y genes de la región constante de anticuerpos humanos, para construir los genes del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE y un vector de expresión eucariota que contuviera dichos genes.

Amplificación por PCR de los fragmentos génicos variables que llevan las secuencias reguladoras: La amplificación por PCR se realizó usando una ADN polimerasa de alta fidelidad, es decir, ADN polimerasa Taq + Pfu, en un sistema de reacción de 100 µl que contenía 10 µl de tampón 10x, 2 µl de dNTP 10 mM, 1 µg de plásmido, 50 pmol de cada uno de los cebadores de amplificación. Después de mezclar, la superficie del sistema de reacción se cubrió con aceite de parafina. Después se incubó en un baño de agua a 95 °C durante 5 min, se añadieron 1-2 u de ADN polimerasa Taq + Pfu a través del aceite de parafina y se inició el siguiente ciclo: 20 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min y 72 °C durante 10 min en el último ciclo.

La construcción y la identificación del vector de expresión eucariota del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE: Los plásmidos de clonación recombinantes pRGWL-C502 y pRGWH-C504 obtenidos e identificados en el Ejemplo 1 se usaron como moldes y los cebadores PVLS y PVNP (para la cadena ligera) y PVHS y PVNP (para la cadena pesada) con sitios de restricción BamH I y Not I con fines de clonación se usaron para la amplificación por PCR, para amplificar las secuencias VL y VH del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental que lleva una secuencia de péptidos líder y un sitio de corte y empalme en el extremo 5'. Mediante amplificación por PCR, el fragmento VL del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental que lleva la secuencia de péptidos líder y un sitio de corte y empalme en el extremo 5' se amplificó a partir del plásmido recombinante para la cadena ligera y el tamaño del fragmento VL fue de aproximadamente 500 pb; el fragmento VH del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental que lleva la secuencia de péptidos líder y un sitio de corte y empalme en el extremo 5' se amplificó a partir del plásmido recombinante para la cadena pesada y el tamaño fue de aproximadamente 700 pb. Los productos de la PCR se aislaron y se recuperaron usando el método Glass Milk y después se digirieron usando BamH I y Not I. De acuerdo con el procedimiento de recombinación de ADN convencional descrito en "*Molecular Cloning*", el fragmento VL se clonó en el sitio correspondiente en pSRNC-Ck y el fragmento VH se clonó en el sitio correspondiente en pSRDC-Cy1 con el fin de obtener los vectores de expresión eucariotas completos del gen del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE. Después los fragmentos VL y VH se unieron respectivamente en los vectores de expresión pSRNC-Ck y pSRDC-Cy1, se escogieron doce clones respectivamente para la selección. A través de la digestión enzimática, se obtuvieron clones recombinantes de la cadena ligera 9 y de la cadena pesada 7. Después de la digestión de la enzima por BamH I y Not I, se identificaron fragmentos VL y VH correspondientes, lo que demuestra que el gen completo del anticuerpo monoclonal anti-antígeno carcinoembrionario y el vector de expresión eucariota del mismo se construyeron satisfactoriamente. A través de dos rondas de secuenciación de nucleótidos, se demostró que las secuencias del gen de la región variable en los vectores de expresión eucariotas del anticuerpo monoclonal anti-antígeno carcinoembrionario pSRNC-Ck-CEA y pSRDC-Cy1-CEA eran completamente idénticas a las secuencias del gene de la región variable contenidas en pRGWL-C502 y pRGWH-C504, respectivamente.

La estructura del vector de expresión eucariota del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE: El sistema de vector de expresión eucariota del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE contiene dos vectores de expresión separados, es decir, el vector de expresión eucariota de la cadena ligera pSRNC-Ck-CEA y el vector de expresión eucariota de la cadena pesada pSRDC-Cy1-CEA, el diagrama esquemático de sus estructuras se muestran en las

Figuras 4 y 5.

### Ejemplo 3: Expresión por las células CHO transfectadas con el vector de expresión de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE

5 Se cultivaron células CHO-dhfr<sup>-</sup> (almacenadas en el laboratorio) en medio de crecimiento completo DMEM con FBS al 10 %, hipoxantina 0,03 mmol/l (H), desoxinucleósido de timidina 0,003 mmol/l (T), prolina 0,1 mmol/l (Pro), glicina 0,1 mmol/l (Gly), penicilina/estreptomicina 100 u/ml, glutamina 2 mmol/l en las condiciones de 5 % de CO<sub>2</sub>, 37 °C. Se realizó un pase de forma sistemática a una relación de 1:10 cada 3-4 días. Los reactivos de cultivo celular anteriores se adquirieron de Gibco corp. Usando el método de transfección génica, se usó el reactivo LipofectAMINA (Gibco) para la transfección. Las células se transfectaron con los vectores de expresión del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE y después se seleccionaron mediante cultivo en un medio sin H, T, Gly. Después de que se formaran los clones, se usó para el cultivo medio selectivo que contenía G418 200 µg/ml (Gibco) para realizar la selección. Como resultado, se usaron 4 µg de cada uno de los vectores de expresión de los genes del anticuerpo quimérico de la cadena ligera y de la cadena pesada para transfectar células CHO-dhfr<sup>-</sup>. Se observó la formación de clones después de aproximadamente 10 días y se contaron en total aproximadamente 350 clones. El sobrenadante del cultivo de los clones resistentes agrupados se midió como DO<sub>490</sub> = 1,622 usando el método de ELISA indirecto, mientras que la DO<sub>490</sub> del sobrenadante de CHO-dhfr<sup>-</sup> de control negativo era de solo 0,063, lo que indica que hubo expresión del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE en el sobrenadante de las células transfectadas.

Tabla 1. Detección de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE en el cultivo celular después de la transfección mediante ELISA

Muestra	DO <sub>490</sub> <sup>a</sup>	DO <sub>490</sub> <sup>b</sup>	DO <sub>490</sub> <sup>c</sup>
sobrenadante 60 horas después de la infección	0,900 ± 0,005	0,900 ± 0,005	1,848 ± 0,021
sobrenadante combinado de los clones (1:10)	0,643 ± 0,004	0,637 ± 0,003	1,622 ± 0,011
sobrenadante del clon 1C5 (1:10)	0,916 ± 0,017	0,913 ± 0,006	1,880 ± 0,010
PBS (IgG1 humana 0 ng/ml)	0,076 ± 0,003	0,070 ± 0,001	-
IgG1 humana 20 ng/ml	0,480 ± 0,007	0,452 ± 0,004	-
IgG1 humana 40 ng/ml	0,895 ± 0,005	0,874 ± 0,002	-
IgG1 humana 60 ng/ml	1,130 ± 0,014	1,050 ± 0,009	-
sobrenadante de CHO-dhfr <sup>-</sup>	0,081 ± 0,003	0,075 ± 0,002	0,063 ± 0,002

a, recubierto con anticuerpo policlonal anti-IgG humana de cabra;

b, recubierto con anticuerpo policlonal anti-cadena κ humana de cabra

c, recubierto con antígeno ACE humano.

### Ejemplo 4: Selección de cepas que pueden expresar altamente anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE por amplificación con metotrexato (MTX)

25 Las células CHO transformadas se cultivaron en medio de crecimiento DMEM completo (Gibco) con FBS al 10 %, penicilina/estreptomicina 100 U/ml, glutamina 2 mmol/l en las condiciones de 5 % de CO<sub>2</sub>, 37 °C. Se realizó un pase de forma sistemática a una relación de 1:10 cada 3-4 días. El método de selección de amplificación por metotrexato (MTX) se usó para seleccionar cepas de alta expresión. Se cultivaron secuencialmente clones celulares con expresión del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE en los sobrenadantes en medio completo que contenía respectivamente metotrexato 3x10<sup>-8</sup> M y 10<sup>-7</sup> M (MTX) (Sigma), para amplificar la expresión con estrés. Después de cada ronda de la expresión por amplificación, se realizó una subclonación mediante dilución limitada, con el fin de seleccionar el clon con mayor rendimiento (Figura 6).

35 El clon 1C5 (con el rendimiento de anticuerpo quimérico de hasta 0,41 mg/ml), que se obtuvo en la primera selección después de la transfección del vector de expresión del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE en células CHO-dhfr<sup>-</sup> y que puede expresar muy eficazmente el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE, se cultivó en un medio que contenía metotrexato 3 x 10<sup>-8</sup> M (MTX) (Sigma). Después del cultivo sucesivo durante aproximadamente 30 días, se observó que la modalidad de células y tasa de crecimiento se recuperaron a la normalidad y las células se adaptaron al MTX 3x10<sup>-8</sup> M. El rendimiento de la expresión del anticuerpo quimérico era de 10,4 µg/ml. Después de la subclonación, se seleccionó el clon 2B2 con el rendimiento de anticuerpo quimérico más alto y el rendimiento de anticuerpo quimérico era de 16 µg/ml. Después del pase en una relación de 1:5, el clon 2B2 se cultivó en un medio completo que contenía MTX 10<sup>-7</sup> M. Después de que las células se adaptaran, el rendimiento del anticuerpo quimérico fue de 32 µg/ml. Después de la subclonación, se seleccionó el clon 3B2 con el rendimiento de anticuerpo quimérico más alto y, a través de una detección preliminar, el rendimiento de anticuerpo quimérico fue tan alto como 80 µg/ml (Figura 7).

### Ejemplo 5: La preparación de la cepa celular adaptada al cultivo en suspensión sin suero y capaz de producir anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE

50 Se usó un método de disminución de suero para preparar la cepa celular (adaptado al cultivo en suspensión sin

siero), con el fin de obtener cepas celulares (adaptadas al cultivo en suspensión sin suero) que puedan expresar y secretar anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE en un nivel alto.

5 Las células rCHO RCC-24 (es decir, clon 3B2), que crecieron forma adherente cuando se cultivaron en un medio que contenía suero y expresaron y secretaron anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE con alta eficacia, se cultivaron en primer lugar en un matraz de cultivo en medio de crecimiento completo DMEM (Gibco) que contenía suero al 5 %. Después se adaptaron y mostraron un crecimiento estable, el medio se reemplazó secuencialmente con medio de crecimiento completo que contenía respectivamente suero al 2 %, al 1 %, al 0,5 %, al 0,25 % de la misma manera. Después se adaptaron y mostraron un crecimiento estable, el medio finalmente se reemplazó con medio sin suero, es decir, medio de crecimiento CHO-S-SFM II (Gibco). En este momento, la mayoría de las células habían perdido la propiedad de crecimiento adherente y el cultivo volvió a ser esencialmente una semi-suspensión. Después de que las células se adaptaran y mostraran un crecimiento estable, las células se cultivaron en matraces de agitación a 80-100 rpm y las células se forzaron para que crecieran en suspensión. Después de que las células se adaptaran y mostraran un crecimiento estable, las nuevas células obtenidas, que son capaces de crecer en cultivo en suspensión sin suero y expresar y secretar eficazmente el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE, se nombraron estirpe celular células rCHO RCC-24(SF).

**Ejemplo 6: La identificación de la especificidad, la propiedad humanizada y la propiedad de direccionamiento *in vivo* del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE**

1. Identificación de la especificidad del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE:

Se realizó un método de PCR-TI, en el que la extracción de ARN total celular se realizó de acuerdo con las instrucciones del reactivo Trizol, específicamente como se describe en el Ejemplo 1. La síntesis de la primera cadena de ADNc se realizó usando MMLV-transcriptasa inversa (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, específicamente como se describe en el Ejemplo 1. En el experimento de amplificación por PCR, el método para la amplificación de los genes de la región variable a partir del ADNc de una célula fue como se ha descrito en los Ejemplos. Los resultados indicaron que, después de la secuenciación, los genes de la región variable cadena ligera y de la cadena pesada (Figura 8) amplificados a partir de la estirpe celular rCHO RCC-24(SF) eran idénticos a los genes de la región variable cadena ligera y de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental original y, por tanto, el anticuerpo monoclonal anti-antígeno carcinoembrionario puede mantener la especificidad del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental y unirse específicamente al ACE.

Se realizó un método de ELISA, en el que se usó ACE 1 µg/ml para recubrir la placa de ELISA. Después se añadió la muestra para las reacciones, después, se añadió el anticuerpo de ELISA de fragmento Fc anti-IgG humana de cabra-HRP (Sigma) (reacción no cruzada con Ig de ratón) o el anticuerpo de ELISA de fragmento Fc anti-IgG de ratón de cabra-HRP (Sigma) (reacción no cruzada con Ig humana); después de la incubación y de la generación de color, se midió el valor de DO490. Posteriormente, se usaron antígenos ACE humano para el recubrimiento de la placa de ELISA y después se usó fragmento Fc anti-IgG humana de cabra-HRP como anticuerpo secundario para realizar el ELISA directo. Tanto el anticuerpo humanizado quimérico anti-ACE en el sobrenadante de las células transformadas como el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE purificado por columna de cromatografía de afinidad a Proteína A pueden unirse al antígeno ACE utilizado para el recubrimiento y pueden ser reconocidos por el anticuerpo policlonal de fragmento Fc anti-IgG humana de cabra, presentando una fuerte reacción positiva. El sobrenadante de cultivo de células CHO-dhfr<sup>-</sup> no transformadas y el anticuerpo monoclonal de ratón parental presentaron una reacción negativa. Cuando se usó fragmento Fc anti-IgG de ratón de cabra-HRP como anticuerpo secundario, tanto el sobrenadante de cultivo de células CHO-dhfr<sup>-</sup> no transformadas como el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE purificado presentaron una reacción negativa, mientras que el anticuerpo monoclonal de ratón parental presentó una reacción positiva. La IgG1 humana de anticuerpo no pertinente fue negativa para ambos casos. Se demostró que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE expresado puede unirse específicamente a los antígenos ACE y tenía la misma especificidad de unión al antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón parental.

Tabla 2. ELISA directo para analizar la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE

Muestra	DO <sub>490</sub> <sup>a</sup>	DO <sub>490</sub> <sup>b</sup>
anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE (purificado, 100 ng/ml)	2,571 ± 0,032	0,072 ± 0,000
IgG1 humana (10 ng/ml)	0,079 ± 0,007	0,077 ± 0,005
anticuerpo monoclonal de ratón parental (100 ng/ml)	0,072 ± 0,003	2,636 ± 0,043
control de PBS	0,070 ± 0,001	0,072 ± 0,001
sobrenadante de células CHO-dhfr <sup>-</sup>	0,076 ± 0,002	0,073 ± 0,002

a, se usó fragmento Fc anti-IgG humana de cabra-HRP se utilizó como anticuerpo secundario; b, se usó fragmento Fc anti-IgG de ratón de cabra-HRP como anticuerpo secundario

Se realizó un experimento de inhibición competitiva, en el que se usó antígeno ACE 1 µg/ml para recubrir la placa de ELISA (Biosdesign). Se añadieron 2,5 ng/pocillo de anticuerpo monoclonal de ratón no pertinente (preparado por los

inventores) o 2,5 ng/pocillo de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental C50 (preparado por los inventores) y diferentes concentraciones de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE. Después de la incubación a 37 °C, se añadió anticuerpo de ELISA de fragmento Fc anti-IgG de ratón de cabra-HRP (Sigma) se añadió; el valor de DO490 se midió después de la reacción y se calculó la tasa de inhibición competitiva de los mismos. La tasa de inhibición competitiva se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: y también se usó control de IgG1 humana de anticuerpo no pertinente.

$$\text{tasa de inhibición competitiva} = \frac{\text{DO490 de anticuerpo monoclonal de ratón solo} - \text{DO490 después de que se añadiera anticuerpo quimérico}}{\text{DO490 de anticuerpo monoclonal de ratón solo}} \times 100\%$$

Los resultados del experimento de inhibición competitiva se muestran en la siguiente tabla, IgG1 humana de anticuerpo no pertinente de control negativo y la reacción del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental no mostraron ningún efecto de inhibición competitiva (la tasa de inhibición competitiva fue del -12,80 %). Cuando la relación entre el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental fue de 2:1, entonces pudo producirse una inhibición competitiva significativa por la unión entre el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental y el antígeno. Con el aumento de la concentración del anticuerpo quimérico, la cantidad de producto de unión entre el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental y el antígeno disminuyó, la DO490 del mismo disminuyó gradualmente y la tasa de inhibición competitiva aumentó. Cuando la relación fue de 32:1, la tasa de inhibición competitiva pudo alcanzar hasta el 40,85 %. Esto indica que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental pueden unirse ambos a los mismos epítomos del antígeno ACE y, por tanto, se demostró que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental tienen la misma especificidad de unión a antígeno.

Tabla 3. Uso de ELISA de inhibición competitiva para examinar la especificidad del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE

Muestra	DO <sub>490</sub>	Tasa de inhibición (%)
2,5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental sobrenadante de células CHO-dhfr <sup>r</sup>	1,394 ± 0,044	-
2,5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental + 80 ng de IgG1 humana	0,000 ± 0,003	0
2,5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental + 2,5 ng de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE	1,573 ± 0,010	-12,8
2,5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental + 5 ng de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE	1,359 ± 0,024	2,5
2,5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental + 10 ng de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE	1,166 ± 0,006	16,36
2,5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental + 20 ng de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE	0,997 ± 0,008	28,52
2,5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental + 40 ng de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE	0,903 ± 0,041	35,22
2,5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental + 80 ng de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE	0,884 ± 0,009	36,59
2,5 ng de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ACE parental + 80 ng de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE	0,825 ± 0,047	40,85

Se realizó un ensayo de inmuno-fluorescencia, en el que se usaron células LS180 de cáncer de colon (adquiridas de ATCC), que pueden expresar ACE en alto nivel, como célula diana, y se añadió anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE. Después de la incubación a 37 °C, se añadió anticuerpo secundario fluorescente FITC anti-IgG humana de cabra (Sigma), se usó un microscopio de fluorescencia para la observación después de la reacción y se usó control de anticuerpo no pertinente como control. Los resultados en la Figura 9 indicaron que, el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE puede reconocer los antígenos ACE en células LS 180 de cáncer de colon que pueden expresar ACE en nivel alto.

Se realizó un ensayo de inmuno-fluorescencia, en el que se usaron varias células cancerosas que expresan ACE SW1116, LOVO (adquiridas de ATCC) como células diana y se añadió anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE. Después de la incubación a 37 °C, se añadió anticuerpo secundario fluorescente Cy5 anti-IgG humana de cabra (Sigma); se usó un microscopio de fluorescencia para la observación después de la reacción y se usó control de anticuerpo no pertinente como control. Los resultados (Figura 10) indicaron que, el anticuerpo monoclonal contra el antígeno carcinoembrionario puede reconocer antígenos ACE en células cancerosas que expresan ACE.

## 2. Identificación de la propiedad humanizada del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE:

En el experimento ELISA, se usaron ACE, anticuerpo policlonal anti-cadena  $\kappa$  humana de cabra (Sigma) o anticuerpo policlonal anti-IgG humana de cabra (Sigma) para recubrir las placas de ELISA, y se usó fragmento Fc anti-IgG humana de cabra-HRP (Sigma) se usó como anticuerpo ELISA. Los resultados de ELISA (tabla 4) indicaron que, el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE purificado presentó una reacción positiva fuerte, mientras que el anticuerpo monoclonal de ratón parental del anticuerpo monoclonal quimérico humanizado anti-ACE presentó una reacción negativa. Esto demostró que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE purificado contenía las regiones constantes de la cadena ligera y de la cadena pesada de la IgG humana.

La Tabla 4. Uso de ELISA para examinar la propiedad humanizada del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE

Muestra (100 ng/ml)	DO <sub>490</sub> <sup>a</sup>	DO <sub>490</sub> <sup>b</sup>	DO <sub>490</sub> <sup>c</sup>
anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE	2,361 ± 0,127	2,870 ± 0,204	2,570 ± 0,169
Anticuerpo monoclonal de ratón parental	0,074 ± 0,000	0,072 ± 0,008	0,074 ± 0,005
IgG1 humana	0,072 ± 0,007	2,887 ± 0,186	2,565 ± 0,198
PBS	0,072 ± 0,005	0,070 ± 0,007	0,070 ± 0,007

a, ACE se usó para el recubrimiento; b, se usó anticuerpo anti-IgG humana de cabra para el recubrimiento; c, se usó anticuerpo anti-cadena  $\kappa$  humana de cabra para el recubrimiento.

Se realizó un experimento de Transferencia Western, en el que se realizó un SDS-PAGE reductor para el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE. Después de que el anticuerpo se transfiriera sobre la membrana, se usaron respectivamente fragmento Fc anti-IgG humana de cabra-HRP o anticuerpo policlonal anti-cadena  $\kappa$  humana de cabra para realizar la transferencia Western. Los resultados (Figura 11) indicaron que, la banda de proteína a 55 kD puede ser reconocida por el anticuerpo fragmento Fc anti-IgG humana de cabra-HRP, formando una sola banda específica que estaba teñida y el tamaño indicado por la banda correspondía a la cadena pesada del anticuerpo. El anticuerpo monoclonal de ratón de control no mostró ninguna banda en esta posición, lo que demuestra que la cadena pesada del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE expresado contenía la región constante humana. La banda de proteína a 25 kD puede ser reconocida por el anticuerpo policlonal anti-cadena  $\kappa$  humana de cabra, presentando una sola banda específica que estaba teñida y el tamaño indicado por esta banda correspondía a la cadena ligera del anticuerpo. El anticuerpo monoclonal de ratón de control presentó una reacción negativa en el presente documento, indicando que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE contenía la región constante de la cadena  $\kappa$  humana.

Se usaron anticuerpo anti-IgG humana de cabra, anti-IgM humana de cabra y anti-IgA humana de cabra para inmunizar suero, se usó un ensayo de doble inmunodifusión para el examen. Los resultados indicaron que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE pertenecía a la inmunoglobulina de tipo IgG humana. Se usaron anticuerpos monoclonales anti-IgG1 humana de ratón, anti-IgG2 humana de ratón, anti-IgG3 humana de ratón y anti-IgG4 humana de ratón para realizar el ensayo ELISA y los resultados indicaron que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE era la IgG1 humana.

## 3. Identificación de la propiedad de direccionamiento *in vivo* del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE:

Se realizaron varios inmuno-experimentos radiactivos *in vivo*, incluyendo el experimento de inmuno-absorción radiactiva *in vivo*, el experimento de inmuno-biodistribución radiactiva *in vivo*, con el fin de examinar el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE para determinar la propiedad de dirigirse específicamente a los tumores *in vivo* (se usaron como modelo ratones que llevaban tumores de células LS174T tumorales de cáncer de colon positivo para ACE). Los resultados indicaron que, después de la inyección de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE marcado con núcleo <sup>125</sup>I, los tumores captaron el anticuerpo más marcado entre todos los tejidos, mucho más que otros tejidos normales, pudiendo alcanzar hasta un 33 % como máximo y pudiendo permanecer un 26 % después de 7d. El anticuerpo marcado puede acumularse bien en los tumores y puede permanecer durante un largo tiempo. Las cantidades de absorción en los tejidos normales fueron bajas y no permanecieron y todo disminuyó rápidamente a medida que pasaba el tiempo en (Figura 12); los resultados del estudio de la relación T/N mostraron que el anticuerpo marcado se distribuyó principalmente en los tumores 24 horas después de ser inyectado y un poco del mismo se distribuyó en la acumulación de sangre. Pero 96 horas más tarde, se distribuyó predominantemente distribuido solo en los tumores, demostrando que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE marcado con núcleo puede distribuirse específicamente en los tumores, pero no en los tejidos normales (Figura 13). Los resultados anteriores indicaron que el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE tenía una excelente propiedad de direccionamiento a los tumores *in vivo* y puede unirse específicamente a las células tumorales positivas para ACE en los animales, con el fin de acumularse y permanecer específicamente en los tumores, mientras que no se distribuyó ni permaneció en tejidos normales distintos de la acumulación de sangre.

### **Ejemplo 7: Preparación de un medicamento de diagnóstico para el diagnóstico por inmuno-formación de imágenes radiactiva *in vivo* usando el anticuerpo quimérico humanizado antiACE**

Se adoptaron experimentos de inmuno-formación de imágenes radiactiva *in vivo* para evaluar la potencia del

medicamento de diagnóstico (preparado usando el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE de la invención) para el diagnóstico por inmuno-formación de imágenes radiactiva *in vivo*. Los resultados, como se muestra en la Figura 14, indicaron que 24 horas después de la inyección del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE marcado con el núcleo <sup>188</sup>Re de la invención, pueden formarse imágenes de los tumores claramente. Los tumores se hicieron aún más claros después de 5-7 días y el tamaño del tumor más pequeño del que pudieron obtenerse imágenes fue de 0,5 cm. Los resultados indican un potencial de aplicación muy bueno para el diagnóstico *in vivo*.

#### Ejemplo 8: Preparación de un medicamento terapéutico para la inmuno-terapia radiactiva *in vivo* de tumores positivos para ACE usando el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE

Se usó núcleo I-131 para marcar el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE (abreviado como rch24, aproximadamente 20 mCi/mg de proteína). La eficacia de la inmuno-terapia radiactiva *in vivo* para destruir los tumores de cáncer de colon se estudió en ratones que llevan tumores trasplantados de células de cáncer de colon humano positivo para ACE LS180 (adquiridas de ATCC, EE.UU.), en los que se inyectó por vía subcutánea un millón de las LS180 en la parte posterior del lado derecho de dichos ratones y las terapias se realizaron después de que el tamaño de los tumores fuera el apropiado. Los resultados indicaron que, en cuanto a los tumores formados (se realizaron terapias después de que el tamaño de los tumores fuera mayor de 0,5 cm<sup>3</sup>), una única terapia, usando 250 µCi/dosis de anticuerpos marcados con una alta inmunoreactividad y una radiactividad específica, mostró una tasa de inhibición del tumor del 81,1 % para los tumores formados (tabla 5, Figura15); mientras que para el grupo de terapia en el que se administró 125 µCi/ratón 3 veces con un intervalo de 1 semana (las terapias se realizaron cuando el tamaño de los tumores era de aproximadamente 0,1 cm<sup>3</sup>), la tasa de inhibición del tumor fue del 93 % (tabla 6, Figura 16) y el crecimiento de los tumores casi se detuvo. En ambos casos el crecimiento del cáncer de colon humano puede inhibirse de manera significativa. El análisis del hemograma y el estudio preliminar de toxicología para la variación de peso corporal indicaron que, cuando se usa anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE marcado con <sup>131</sup>I para la inmunoterapia radiactiva *in vivo* del cáncer de colon humano, cada uno de los componentes en el hemograma y el peso corporal de los ratones no fueron significativamente diferentes entre el grupo de terapia y el grupo control, lo que demuestra que no tiene ninguna toxicidad aparente.

Tabla 5. La tasa de inhibición del tumor de la terapia única usando 250 µCi/dosis contra tumores formados fue del 81,1 %

Grupos	Número	Peso promedio de tumor (X ± DT, g)	Tasa de inhibición (%)	Valor de P
PBS	6	4,048 ± 2,428	-	
hIgG	6	3,859 ± 1,928	-	
rch24	6	0,765 ± 0,442	81,1	<0,038

Tabla 6. La tasa de inhibición del tumor de la terapia de 3 dosis usando 125 µCi/dosis de anticuerpo marcado fue del 93 %

Grupos	Dosis	Peso promedio de tumor (X ± DT, g)	Tasa de inhibición (%)	Valor de P
hIgG	150 µCi/ratón x 3	8,18 ± 6,13	-	
rch24	150 µCi/ratón x 3	0,57 ± 0,47	93,04	<0,05

En el modelo de ratones desnudos que llevan cáncer de intestino grueso humano, se observó la actividad antitumoral *in vivo* de la muestra sometida a ensayo (es decir, el anticuerpo quimérico anti-ACE marcado con <sup>131</sup>I, rch24). Método: 8-10 días después que se inocularan por vía subcutánea células de cáncer de intestino grueso humano LS180, LS174T y SW1116, respectivamente, a ratones desnudos BABL/c nu/nu, a diferentes grupos se les administró de la muestra respectivamente. Sobre la base de un principio equilibrado de acuerdo con el tamaño de los tumores, los grupos se dividieron como: grupo de control; grupos de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE rch24 "desnudos" (grupo 156,2 µg/kg y grupo 625,0 µg/kg); grupos de IgG humana no pertinente marcada con una radiactividad específica idéntica (grupo 3,1 mCi/kg y grupo 12,5 mCi/kg); grupos de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE rch24 marcado con <sup>131</sup>I (grupo 3,1 mCi/kg, grupo 6,25 mCi/kg y grupo 12,5 mCi/kg); y grupo de control de medicamento de quimioterapia positivo. Las muestras sometidas a ensayo y las muestras de control pertinentes se administraron a través de inyección en la vena caudal, una vez cada diez días y dos veces en total. De manera regular, se observaron las condiciones generales de los animales, se midió el peso corporal, se midieron los tamaños de los tumores, se midieron el nivel de ACE en suero y el índice de la sangre periférica y se determinó la distribución de los isótopos en los tejidos tumorales y los tejidos no tumorales. Los ratones desnudos que llevaban tumores se sacrificaron al final del experimento y se midieron los pesos de los tumores. Resultados: un ratón desnudo murió en el grupo de dosis alta de la muestra sometida a ensayo (anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE rch24 marcado con <sup>131</sup>I) y un ratón desnudo murió en el grupo de dosis alta de la IgG humana no pertinente marcada con radiactividad específica idéntica. Después de la administración, en todos los grupos de la muestra sometida a ensayo, los tamaños de los tumores eran más pequeños que los del grupo de control y la tasa de proliferación tumoral relativa era más baja que la del grupo de control. La tasa de inhibición del tumor para las tres cepas tumorales LS180, LS174, SW1116 fue del 47,8-71,4 % en el grupo de dosis baja, del 52,2-75,0 % en el grupo de dosis moderada y del 65,2-86,2 % en el grupo de dosis alta. Los niveles séricos de ACE de los ratones desnudos en todos los grupos de la muestra sometida a ensayo eran claramente inferiores a los del grupo de control. Cuando

se compara con grupos de diferentes dosis del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE "desnudo" y de la IgG humana no pertinente marcada con 131I, los efectos de inhibición tumoral fueron más significativos en los grupos de la muestra sometida a ensayo correspondiente. En cuanto al efecto de inhibición tumoral para las tres cepas tumorales, la muestra sometida a ensayo de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE rch24 marcado con 131I fue más potente para inhibir el crecimiento de los tumores LS180. 48 horas y 96 horas después de la primera administración, la distribución de los isótopos en los tejidos tumorales era claramente más alta que en los tejidos no tumorales. 30 días después de la administración, los índices tales como el recuento de leucocitos en sangre periférica etc. en los ratones desnudos del grupo de administración no fueron significativamente diferentes a los del grupo de control. Conclusión: la muestra sometida a ensayo de anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE rch24 marcado con 131I puede inhibir significativamente el crecimiento del cáncer de intestino grueso humano en ratones de una manera dependiente de la dosis y puede disminuir simultáneamente el nivel de ACE en suero en ratones desnudos que llevan tumores, y, la distribución dirigida de la misma en los tejidos tumorales fue significativa. La administración se realizó dos veces con un intervalo de diez días y, después de 30 días, la función hematológica de los ratones desnudos que llevaban tumores en el grupo administrado no cambió claramente.

Tabla 7: el efecto del anticuerpo quimérico anti-ACE marcado con 131I sobre el peso del tumor y la tasa de inhibición tumoral en ratones desnudos que llevan tumores (LS 180, lote 1)

Grupo	Peso del tumor (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
Grupo de control	2,8 ± 0,8	-
Grupo de dosis baja de rch24	1,7 ± 0,5 *	39,3
Grupo de dosis alta de rch24	1,4 ± 0,3 **	50,0
Grupo de dosis baja de IgG humana	1,1 ± 0,2 ***	60,7
Grupo de dosis alta de IgG humana	1,9 ± 0,2 ***	67,9
Grupo de 3,1 mCi/kg	0,8 ± 0,2 ***	71,4
Grupo de 6,25 mCi/kg	0,7 ± 0,2 *** ### &&	75,0
Grupo de 12,5 mCi/kg	0,4 ± 0,1 *** \$\$\$ @@@ !!	85,7
Grupo de control positivo	1,6 ± 0,3 **	42,9

Nota: en comparación con el grupo de control, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de rch24, # p <0,05, ## p <0,01; en comparación con el grupo de dosis alta de rch24, \$\$\$ p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de IgG, && p <0,01; en comparación con el grupo de dosis alta de IgG, @@@ p <0,001; en comparación con el grupo de 6,25mCi/kg, !! p <0,01.

Tabla 8: el efecto del anticuerpo quimérico anti-ACE marcado con 131I sobre el peso del tumor y la tasa de inhibición tumoral en ratones desnudos que llevan tumores (LS180, lote 2)

Grupo	Peso del tumor (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
Grupo de control del modelo	2,9 ± 0,6	-
Grupo de dosis baja de rch24	1,8 ± 0,2 ***	37,9
Grupo de dosis alta de rch24	1,5 ± 0,1 ***	48,3
Grupo de dosis baja de IgG humana	1,2 ± 0,1 ***	58,6
Grupo de dosis alta de IgG humana	1,0 ± 0,2***	65,5
Grupo de 3,1 mCi/kg	0,9 ± 0,3***	69,0
Grupo de 6,25 mCi/kg	0,8 ± 0,1*** ### &&&	72,4
Grupo de 12,5 mCi/kg	0,4 ± 0,1*** \$\$\$ @@@ !!!	86,2
Grupo de control positivo	1,7 ± 0,2 ***	41,4

Nota: en comparación con el grupo control del modelo, \*\*\* p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de rch24, ### p <0,001; en comparación con el grupo de dosis alta de rch24, \$\$\$ p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de IgG, &&& p <0,001; en comparación con el grupo de dosis alta de IgG, @@@ p <0,001; en comparación con el grupo de 6,25 mCi/kg, !!! p <0,001.

Tabla 9 el efecto del anticuerpo quimérico anti-ACE marcado con 131I sobre el peso del tumor y la tasa de inhibición tumoral en ratones desnudos que llevan tumores (LS174T, lote 1)

Grupo	Peso del tumor (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
Grupo de control del modelo	2,5 ± 0,2	-
Grupo de dosis baja de rch24	1,6 ± 0,3 ***	36,0
Grupo de dosis alta de rch24	1,3 ± 0,2 ***	48,0
Grupo de dosis baja de IgG humana	1,1 ± 0,2 ***	56,0
Grupo de dosis alta de IgG humana	1,0 ± 0,2 ***	60,0
Grupo de 3,1 mCi/kg	0,9 ± 0,1***	64,0
Grupo de 6,25 mCi/kg	0,7 ± 0,1*** ### &&& %	72,0
Grupo de 12,5 mCi/kg	0,5 ± 0,1*** \$\$\$ @@@	80,0

Grupo de control positivo 1,4 ± 0,2 \*\*\* 44,0

Nota: en comparación con el grupo control del modelo, \*\*\* p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de rch24, ### p <0,001; en comparación con el grupo de dosis alta de rch24, \$\$\$ p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de IgG, &&& p <0,001; en comparación con el grupo de 3,1 mCi/kg, % p <0,05; en comparación con el grupo de dosis alta de IgG, @@@ p <0,001.

Tabla 10 el efecto del anticuerpo quimérico anti-ACE marcado con 131I sobre el peso del tumor y la tasa de inhibición tumoral en ratones desnudos que llevan tumores (LS174T, lote 2)

Grupo	Peso del tumor (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
Grupo de control del modelo	2,6 ± 0,2	-
Grupo de dosis baja de rch24	1,7 ± 0,2 ***	34,6
Grupo de dosis alta de rch24	1,5 ± 0,1 ***	42,3
Grupo de dosis baja de IgG humana	1,3 ± 0,1***	50,0
Grupo de dosis alta de IgG humana	1,1 ± 0,1 *** ###	57,7
Grupo de 3,1 mCi/kg	1,0 ± 0,1*** ###	61,5
Grupo de 6,25 mCi/kg	0,8 ± 0,1*** ### &&& %	69,2
Grupo de 12,5 mCi/kg	0,7 ± 0,1*** \$\$\$ @@@ !	73,1
Grupo de control positivo	1,4 ± 0,2 ***	46,2

Nota: en comparación con el grupo de control del modelo, \*\*\* p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de rch24, ### p <0,001; en comparación con el grupo de dosis alta de rch24, \$\$\$ p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de IgG, &&& p <0,001; en comparación con el grupo de 3,1 mCi/kg, % p <0,05; en comparación con el grupo de dosis alta de IgG, @@@ p <0,001; en comparación con el grupo de 6,25 mCi/kg, ! p <0,05.

5 Tabla 11 el efecto del anticuerpo quimérico anti-ACE marcado con 131I sobre el peso del tumor y la tasa de inhibición tumoral en ratones desnudos que llevan tumores (SW1116, lote 1)

Grupo	Peso del tumor (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
Grupo de control del modelo	2,2 ± 0,1	-
Grupo de dosis baja de rch24	1,6 ± 0,2 ***	27,3
Grupo de dosis alta de rch24	1,4 ± 0,2 ***	36,4
Grupo de dosis baja de IgG humana	1,2 ± 0,2 ***	45,5
Grupo de dosis alta de IgG humana	1,0 ± 0,1 ***	54,5
Grupo de 3,1 mCi/kg	0,9 ± 0,2 ***	59,1
Grupo de 6,25 mCi/kg	0,8 ± 0,2*** ### &&	63,6
Grupo de 12,5 mCi/kg	0,7 ± 0,1*** \$\$\$ @@@	68,2
Grupo de control positivo	1,5 ± 0,2 ***	31,8

Nota: en comparación con el grupo de control del modelo, \*\*\* p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de rch24, ### p <0,001; en comparación con el grupo de dosis alta de rch24, \$\$\$ p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de IgG, && p <0,01; en comparación con el grupo de dosis alta de IgG, @@@ p <0,001.

10 Tabla 12 el efecto del anticuerpo quimérico anti-ACE marcado con 131I sobre el peso del tumor y la tasa de inhibición tumoral en ratones desnudos que llevan tumores (SW1116, lote 2)

Grupo	Peso del tumor (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
Grupo de control del modelo	2,3 ± 0,1	-
Grupo de dosis baja de rch24	1,7 ± 0,2 ***	26,1
Grupo de dosis alta de rch24	1,5 ± 0,2 ***	34,8
Grupo de dosis baja de IgG humana	1,4 ± 0,1 ***	39,1
Grupo de dosis alta de IgG humana	1,3 ± 0,3***	43,5
Grupo de 3,1 mCi/kg	1,2 ± 0,1 ***	47,8
Grupo de 6,25 mCi/kg	1,1 ± 0,1 *** ### &&&	52,2
Grupo de 12,5 mCi/kg	0,8 ± 0,1*** \$\$\$ @@@ !!	65,2
Grupo de control positivo	1,5 ± 0,2***	34,8

Nota: en comparación con el grupo de control del modelo, \*\*\* p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de rch24, ### p <0,001; en comparación con el grupo de dosis alta de rch24, \$\$\$ p <0,001; en comparación con el grupo de dosis baja de IgG, &&& p <0,001; en comparación con el grupo de dosis alta de IgG, @@@ p <0,001; en comparación con el grupo de 6,25 mCi/kg, !! p <0,01.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SHANGHAI HAIKANG PHARMACEUTICAL TECH. & DEVE. CO., LTD.

5 <120> ANTICUERPO DIRIGIDO CONTRA EL ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO Y USOS DEL MISMO

<130> I201002047CB

<160> 15

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 450

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> quimérico

20 <400> 1

ES 2 655 998 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ile Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys His Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Pro Glu Asn Val Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Asn His Tyr Arg Tyr Ala Gly Gly Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

ES 2 655 998 T3

180 185 190  
 Ser Ser Ser<sub>195</sub> Leu Gly Thr Gln Thr<sub>200</sub> Tyr Ile Cys Asn Val<sub>205</sub> Asn His Lys  
 Pro Ser<sub>210</sub> Asn Thr Lys Val Asp<sub>215</sub> Lys Lys Val Glu Pro<sub>220</sub> Lys Ser Cys Asp  
 Lys Thr His Thr Cys Pro<sub>230</sub> Pro Cys Pro Ala Pro<sub>235</sub> Glu Leu Leu Gly Gly<sub>240</sub>  
 Pro Ser Val Phe Leu<sub>245</sub> Phe Pro Pro Lys Pro<sub>250</sub> Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 Ser Arg Thr Pro<sub>260</sub> Glu Val Thr Cys Val<sub>265</sub> Val Val Asp Val Ser His Glu  
 Asp Pro Glu<sub>275</sub> Val Lys Phe Asn Trp<sub>280</sub> Tyr Val Asp Gly Val<sub>285</sub> Glu Val His  
 Asn Ala<sub>290</sub> Lys Thr Lys Pro Arg<sub>295</sub> Glu Glu Gln Tyr Asn<sub>300</sub> Ser Thr Tyr Arg  
 Val Val Ser Val Leu Thr<sub>310</sub> Val Leu His Gln Asp<sub>315</sub> Trp Leu Asn Gly Lys<sub>320</sub>  
 Glu Tyr Lys Cys Lys<sub>325</sub> Val Ser Asn Lys Ala<sub>330</sub> Leu Pro Ala Pro Ile<sub>335</sub> Glu  
 Lys Thr Ile Ser<sub>340</sub> Lys Ala Lys Gly Gln<sub>345</sub> Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 Thr Leu Pro<sub>355</sub> Pro Ser Arg Asp Glu<sub>360</sub> Leu Thr Lys Asn Gln<sub>365</sub> Val Ser Leu  
 Thr Cys<sub>370</sub> Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile<sub>380</sub> Ala Val Glu Trp  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro<sub>390</sub> Glu Asn Asn Tyr Lys<sub>395</sub> Thr Thr Pro Pro Val<sub>400</sub>  
 Leu Asp Ser Asp Gly<sub>405</sub> Ser Phe Phe Leu Tyr<sub>410</sub> Ser Lys Leu Thr Val Asp<sub>415</sub>  
 Lys Ser Arg Trp<sub>420</sub> Gln Gln Gly Asn Val<sub>425</sub> Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 Glu Ala Leu<sub>435</sub> His Asn His Tyr Thr<sub>440</sub> Gln Lys Ser Leu Ser<sub>445</sub> Leu Ser Pro  
 Gly Lys

450

ES 2 655 998 T3

<210> 2  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> quimérico

10

<400> 2

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Val Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Asn Asn Pro Tyr Ser  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Val Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro Ser  
 100 105 110  
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala  
 115 120 125  
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val  
 130 135 140  
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser  
 145 150 155 160  
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr  
 165 170 175  
 Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys  
 180 185 190  
 Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn  
 195 200 205  
 Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 3

ES 2 655 998 T3

<211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 3  
 gacattcagc tgaccagtc tcca 24  
 10 <210> 4  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 4  
 20 gttagatctc cagcttggtc cc 22  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 5  
 aggtsmarct gcagsagtcw gg 22  
 <210> 6  
 <211> 34  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 6  
 tgaggagacg gtgaccgtgg tcccttgcc ccag 34  
 <210> 7  
 <211> 5  
 45 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 7  
 50  
 His Tyr Tyr Met His  
 1 5  
 <210> 8  
 <211> 17  
 55 <212> PRT  
 <213>  
 <400> 8

Trp Ile Asn Pro Glu Asn Val Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

ES 2 655 998 T3

	1	5	10	15
	Gly			
5	<210> 9 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>			
10	<400> 9  Tyr Arg Tyr Ala Gly Gly Gly Ala Leu Asp Tyr 1 5 10			
15	<210> 10 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>			
20	<400> 10  Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His 1 5 10			
25	<210> 11 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>			
30	<400> 11  Gln Gln Trp Asn Asn Asn Pro Tyr Ser 1 5			
35	<210> 12 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>			
40	<400> 12  Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser 1 5			
45	<210> 13 <211> 64 <212> ADN <213> Artificial			
50	<220> <223> Cebador  <400> 13  gggtc <sup>1</sup> caagc ttg <sup>5</sup> cggccgc aactgaggaa gcaaagt <sup>5</sup> tta aattctactc acgtttgatc acca			
				60 64

# ES 2 655 998 T3

<210> 14  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Artificial  
5  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 14  
10 gctcgggaat tcggatccat gggatggagc tgtatcatcc 40  
  
<210> 15  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 15  
20 gggtcggaat tcgggccgc tataaatctc tggccatgaa g 41

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal quimérico humanizado específico para el antígeno carcinoembrionario (ACE), en donde el anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada que comprende regiones CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 7-9 y una cadena ligera que comprende regiones CDR como se exponen en las SEQ ID NO: 10-12.
- 10 2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo quimérico humanizado de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una secuencia complementaria del mismo.
4. El ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, que es ADN o ARN.
5. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, o del ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en la preparación de un medicamento antitumoral.
- 20 6. Uso del anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en la preparación de un agente de diagnóstico tumoral.
7. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en el que dicho tumor es cáncer colorrectal.
- 25 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho medicamento antitumoral comprende dicho anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 acoplado a un agente de inmunoterapia radiactivo como principio activo y dicho agente de inmunoterapia radiactivo es <sup>131</sup>I.
- 30 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho agente de diagnóstico tumoral comprende dicho anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 acoplado a un agente de inmuno-formación de imágenes radiactivo como principio activo y dicho agente de inmuno-formación de imágenes radiactivo es <sup>188</sup>Re.



Figura 1: el análisis para el ARN total extraído de la célula de hibridoma del anticuerpo monoclonal de ratón parental usando electroforesis en gel de agarosa.

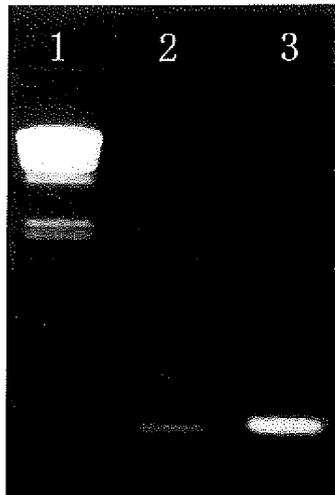


Figura 2: el análisis para los productos de la PCR de los genes VL, VH del anticuerpo monoclonal de ratón parental usando electroforesis en gel de agarosa.

ES 2 655 998 T3

VL:

	9		18		27		36		45		54						
GAC	ATC	CAG	CTG	ACC	CAG	TCT	CCA	GCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG
Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys
	63		72		81		90		99		108						
GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATA	CAC	TGG	TAT	CAG
Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Ile	His	Trp	Tyr	Gln
	----- CDR1 -----																
	117		126		135		144		153		162						
CAG	AAG	TCA	GGC	ACC	TCC	CCC	AAA	AGA	TGG	GTT	TAT	GAC	ACA	TCC	AAA	CTG	GCT
Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Val	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala
	----- CDR2 -----																
	171		180		189		198		207		216						
TCT	GGA	GTC	CCT	GCT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC
Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu
	-----																
	225		234		243		252		261		270						
ACA	ATC	AGC	ACC	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	CAG	TGG
Thr	Ile	Ser	Thr	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
	-----																
	279		288		297		306		315								
AAT	AAT	AAC	CCA	TAC	TCG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	GTG	GAG	ATC			
Asn	Asn	Asn	Pro	Tyr	Ser	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile			
	----- CDR3 -----																

VH:

	9		18		27		36		45		54						
CAG	GTC	CAA	CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCA	GAA	CTT	GTG	AGG	TCA	GGG	GCC	TCA	ATC
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Ile
	63		72		81		90		99		108						
AAG	TTG	TCC	TGC	ACA	GCT	TCT	GGC	TTC	AAC	ATT	AAA	CAC	TAC	TAT	ATG	CAC	TGG
Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	His	Tyr	Tyr	Met	His	Trp
	----- CDR1 -----																
	117		126		135		144		153		162						
GTG	AAA	CAG	AGG	CCT	GAA	CAG	GGC	CTG	GAG	TGG	ATT	GGA	TGG	ATT	AAT	CCT	GAG
Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Glu
	-----																
	171		180		189		198		207		216						
AAT	GTT	GAT	ACT	GAA	TAT	GCC	CCC	AAG	TTC	CAG	GGC	AAG	GCC	ACT	ATG	ACT	GCA
Asn	Val	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Ala
	----- CDR2 -----																
	225		234		243		252		261		270						
GAC	ACA	TCC	TCC	AAC	ACA	GCC	TAC	CTG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC
Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
	279		288		297		306		315		324						
ACT	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	AAT	CAC	TAT	AGG	TAC	GCC	GGA	GGG	GGT	GCT	TTG	GAC
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	His	Tyr	Arg	Tyr	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Leu	Asp
	----- CDR3 -----																
	333		342		351		360										
TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	3'					
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						

Figura 3: las secuencias de nucleótidos de los genes VL, VH del anticuerpo monoclonal de ratón parental obtenidas mediante amplificación y secuencias de aminoácidos de las mismas , así como secuencias CDR (las CDR están subrayadas).

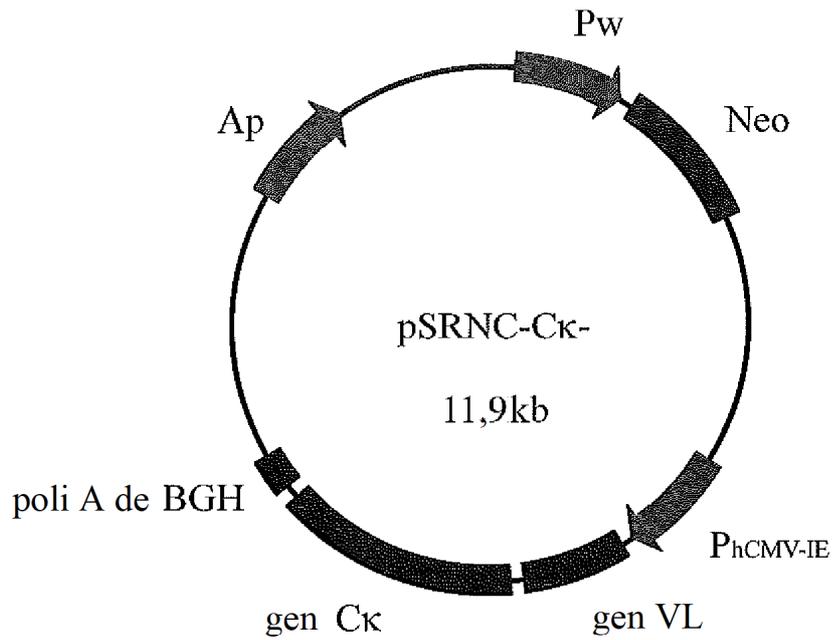


Figura 4: el diagrama esquemático para la estructura del vector de expresión eucariota de la cadena ligera del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE pSRNC-Cκ-CEA.

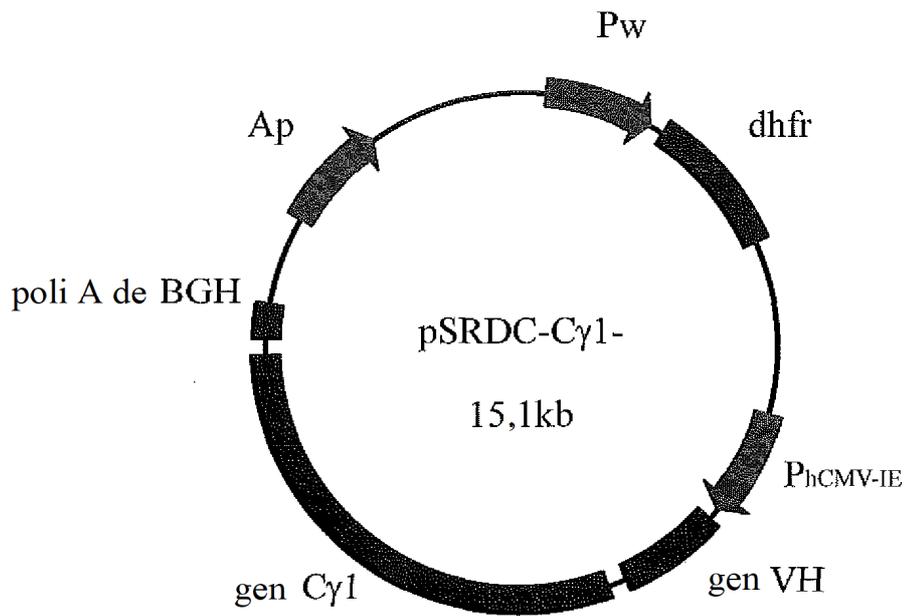


Figura 5: el diagrama esquemático para la estructura del vector de expresión eucariota de la cadena pesada del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE pSRDC-C $\gamma$ 1-CEA.

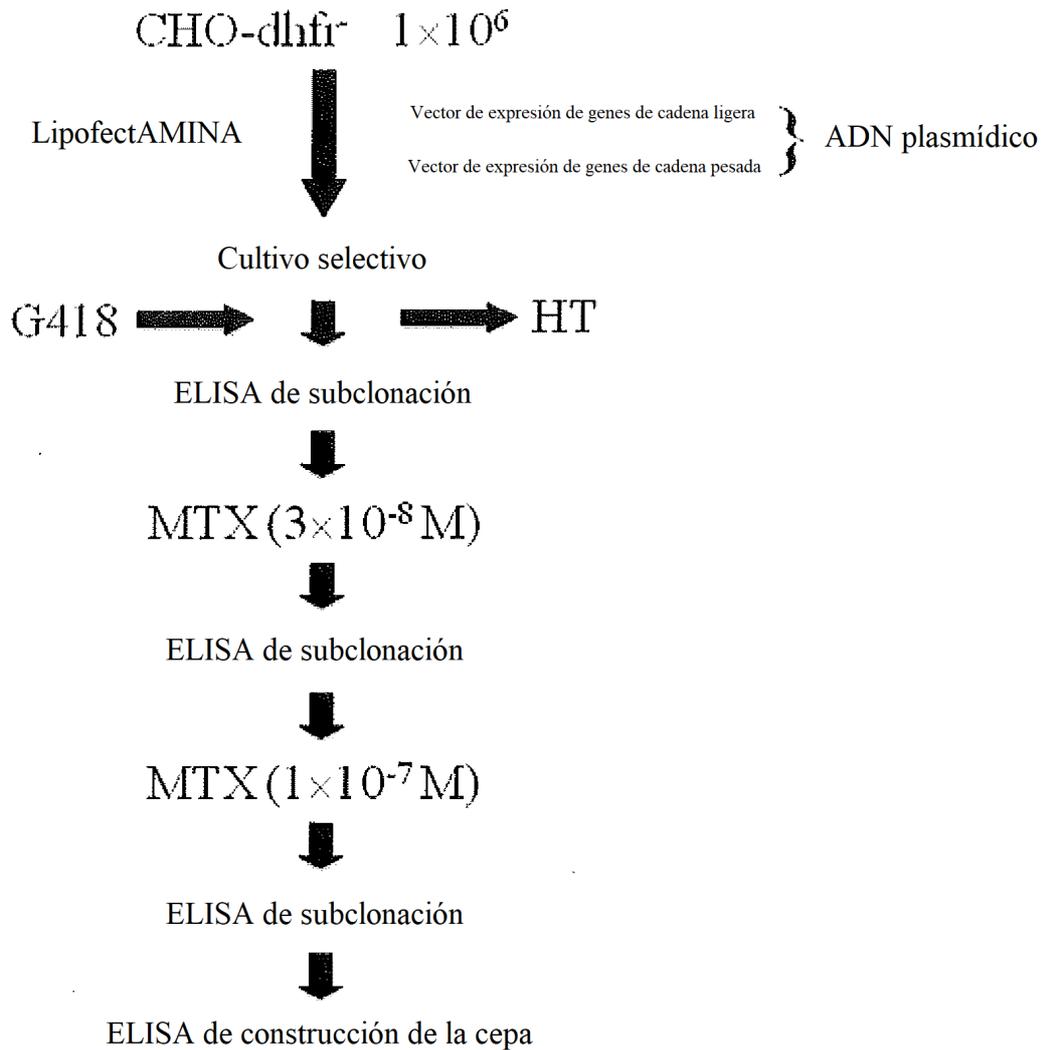


Figura 6: los procesos de construcción y detección de la cepa de células que expresa y secreta anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE en nivel alto

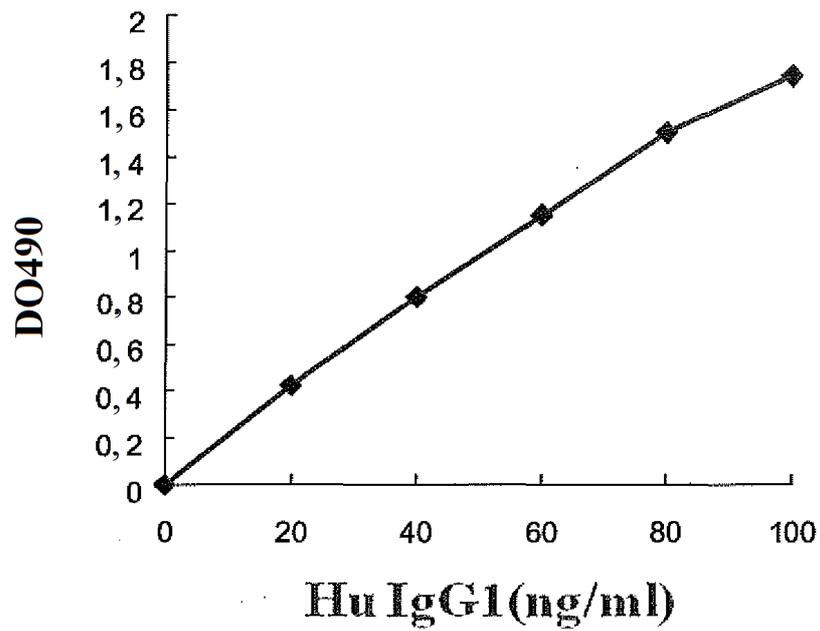


Figura 7: el contenido de anticuerpo quimérico en el sobrenadante de la cepa de células CHO que expresa y secreta anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE medido usando el método ELISA.

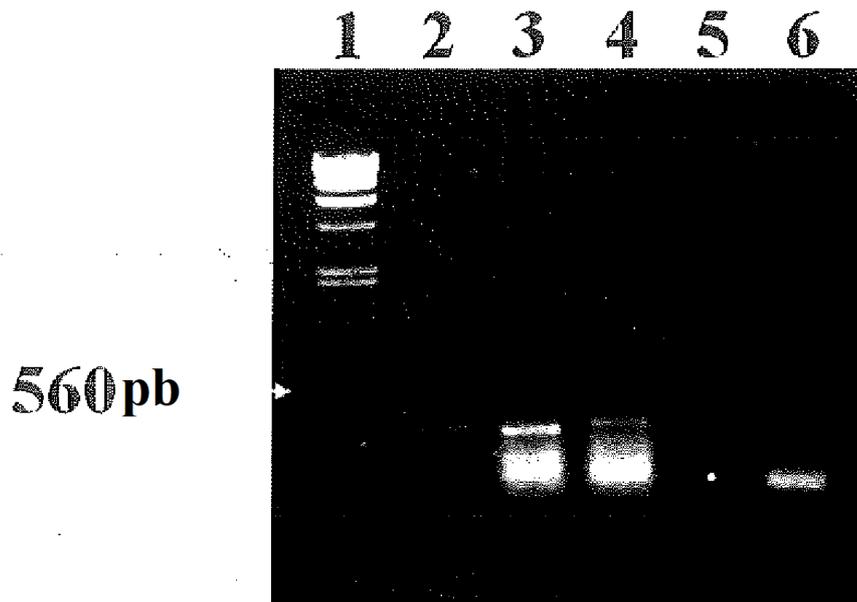
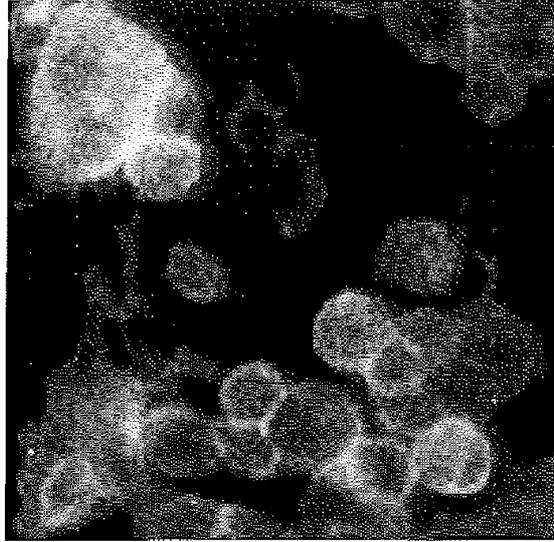
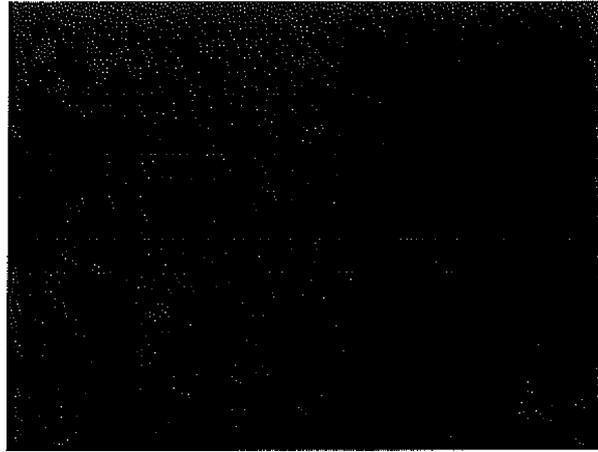


Figura 8: la especificidad antigénica del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE analizada mediante PCR-TI.



Células LS180

Figura 9: la especificidad antigénica del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE analizada usando inmuno-fluorescencia.



SW1116



LOVO

Figura 10: el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE puede reconocer los antígenos ACE en varias células cancerosas que expresan ACE.

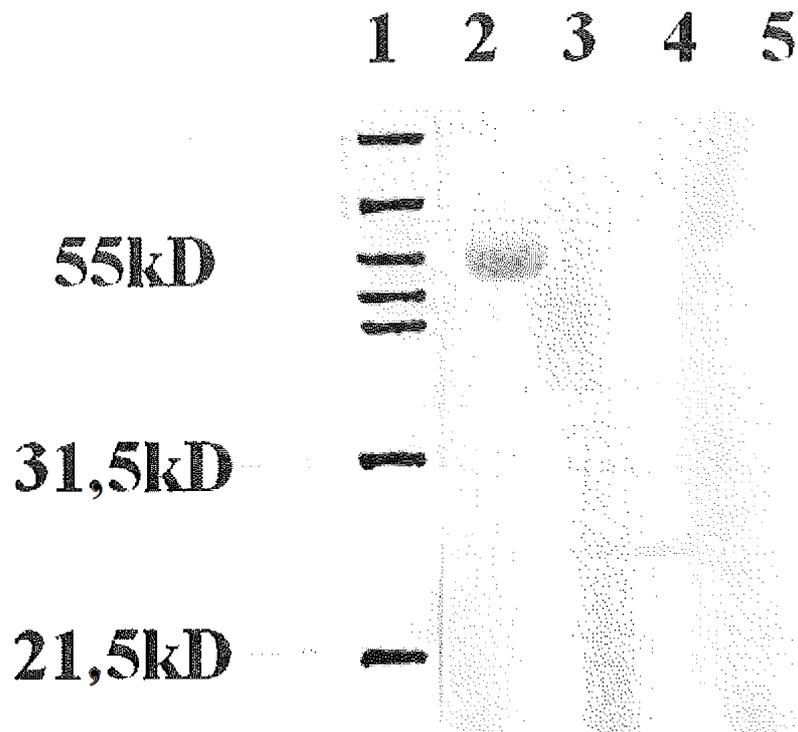


Figura 11: la propiedad humanizada del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE analizada usando Transferencia de Western.

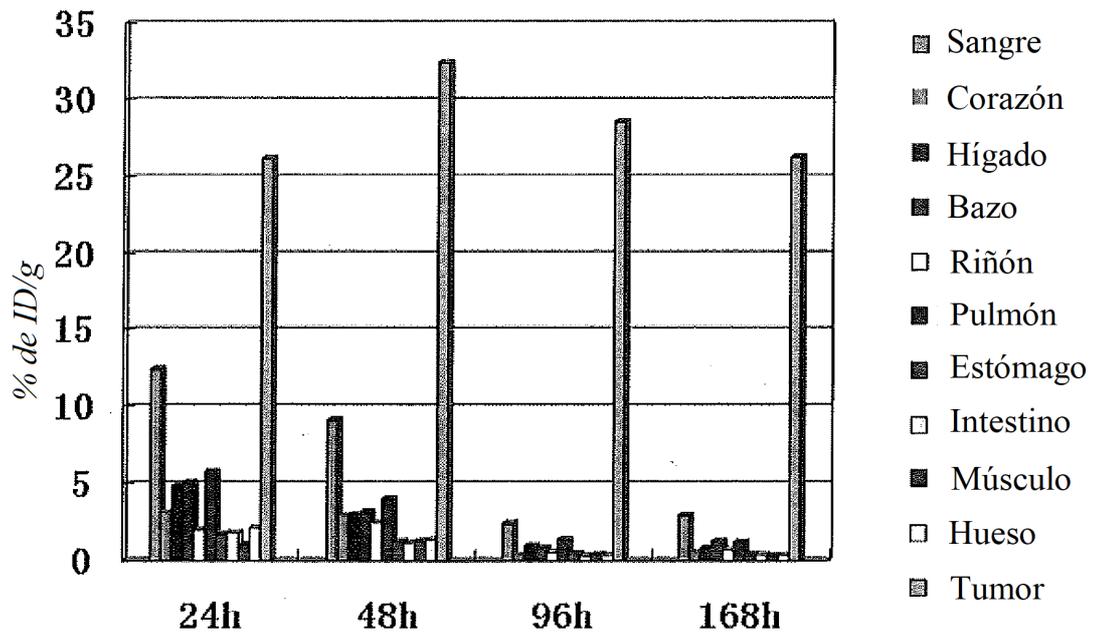


Figura 12: los resultados del análisis de la captación de la dosis radiactiva expresado como porcentaje por gramo de tejido (% de DI/g) del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE.

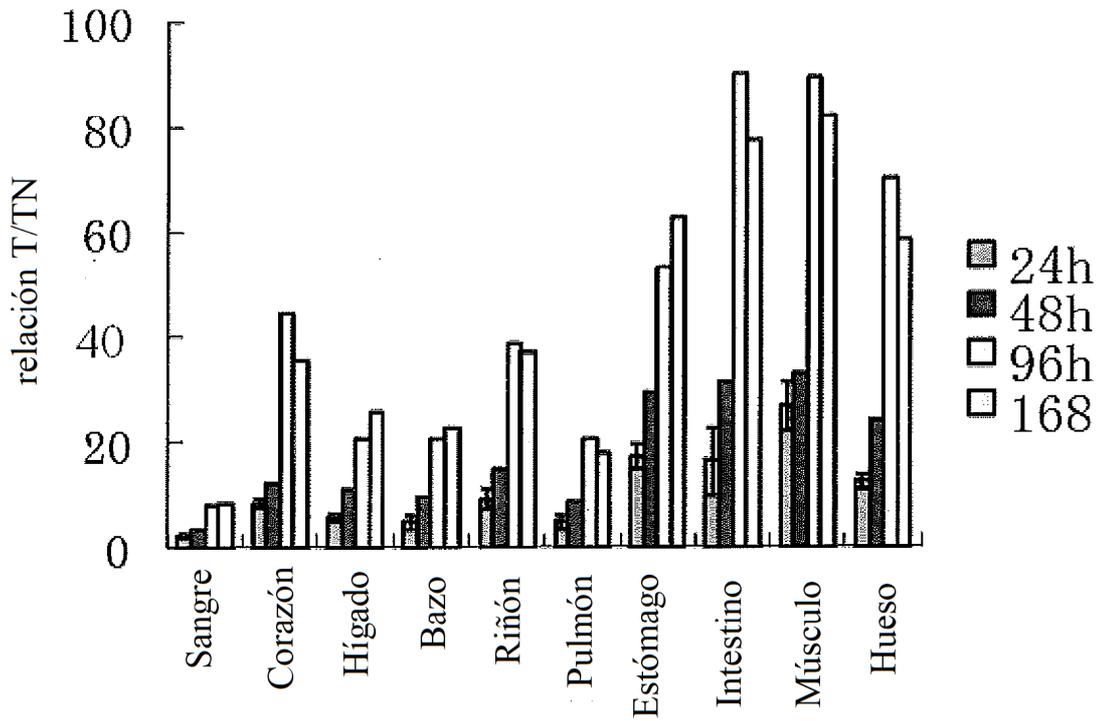


Figura 13: los resultados de la relación de radiactividad del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE entre el tejido tumoral y el tejido normal (T/TN).

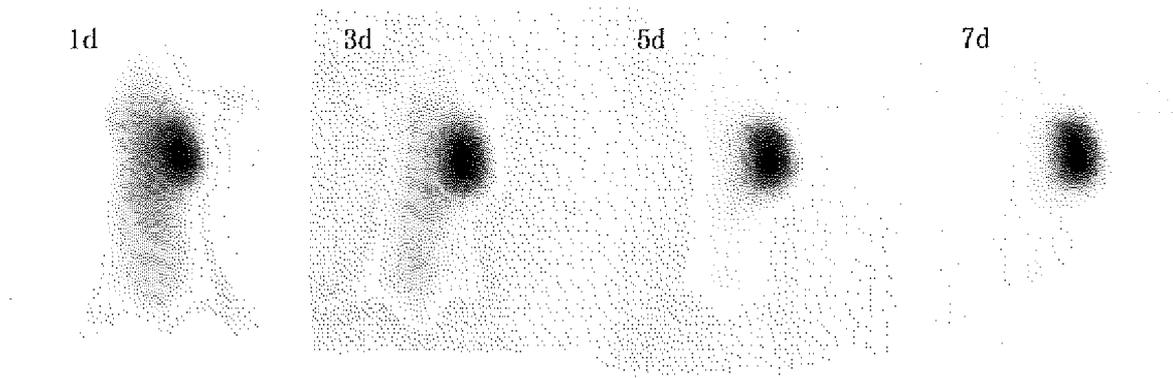


Figura 14: la inmuno-formación de imágenes radiactivas *in vivo* de los tumores de cáncer de colon positivo para ACE mediante el anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE.

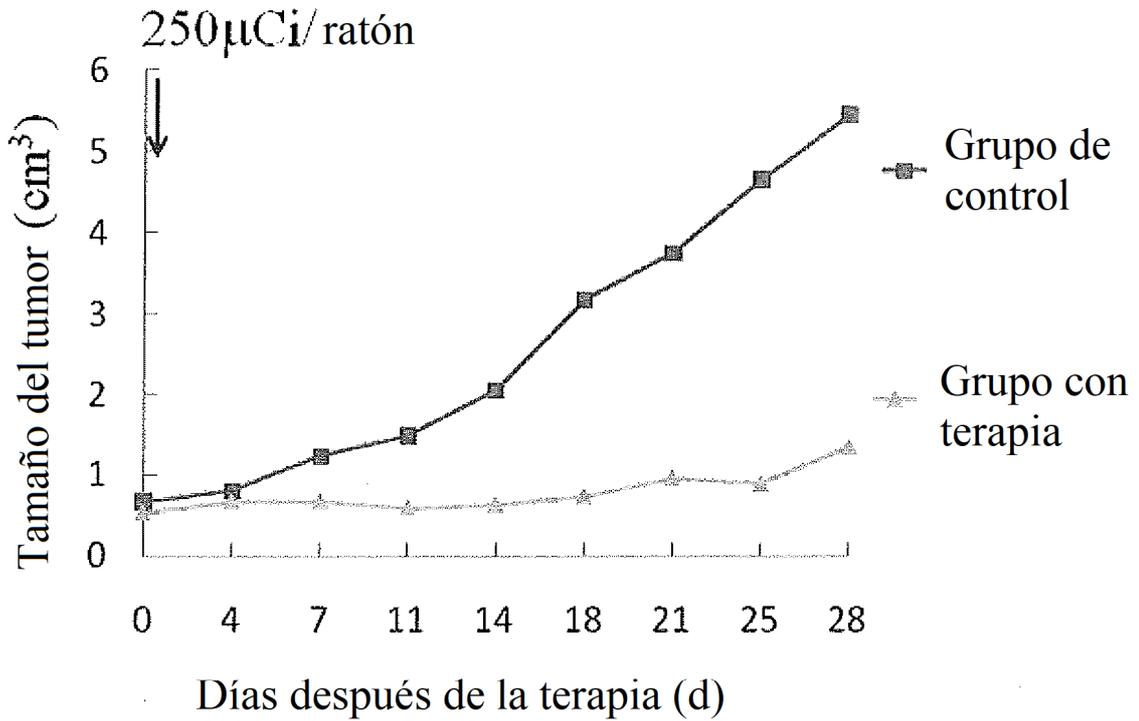


Figura 15: los resultados de la terapia del modelo de tumor trasplantado de ratón desnudo que lleva cáncer de colon humano mediante una sola administración del conjugado del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE e I-13 (curva de crecimiento).

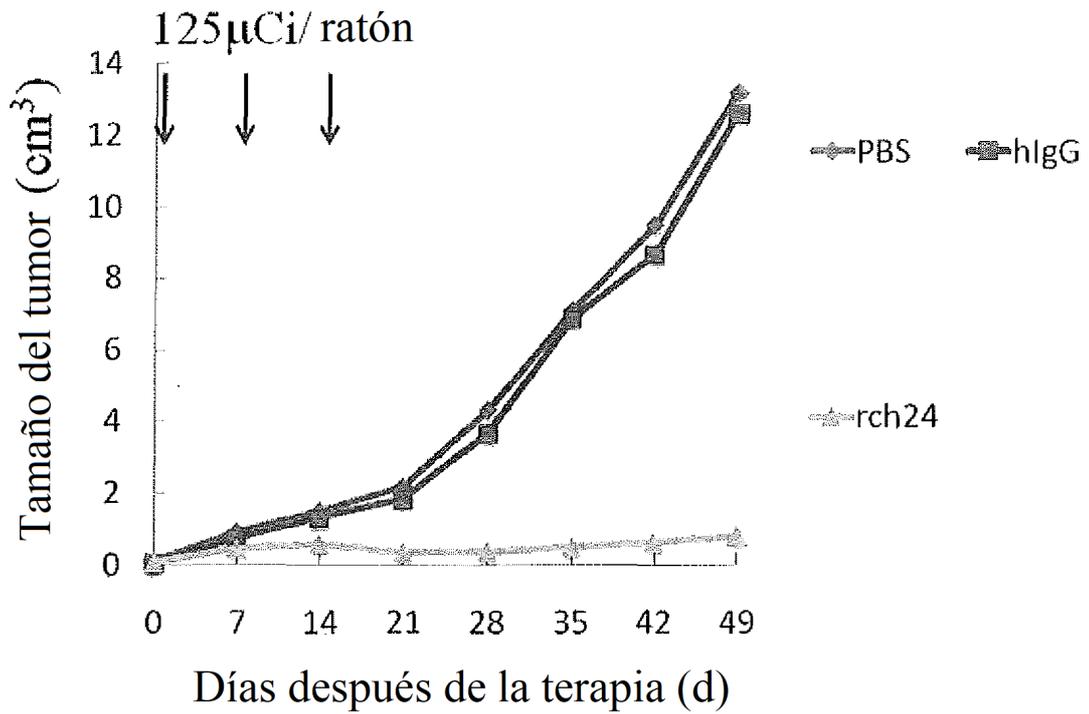


Figura 16: los resultados de la terapia del modelo de tumor trasplantado de ratón desnudo que lleva cáncer de colon humano mediante administraciones múltiples del conjugado del anticuerpo quimérico humanizado anti-ACE e I-13 (curva de crecimiento).