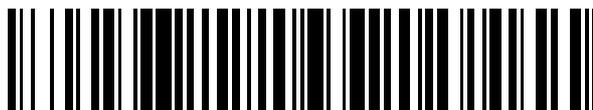


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 952**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2007 PCT/US2007/013587**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2007 WO07146172**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2007 E 07795937 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2044120**

54 Título: **Anticuerpos que reconocen un epítipo que contiene carbohidratos en CD-43 y CEA expresados en células cancerosas y métodos que los usan**

30 Prioridad:

**07.06.2006 US 811850 P**

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

**05.07.2019**

73 Titular/es:

**BIOALLIANCE C.V. (100.0%)  
Kingsfordweg 103  
1043 GP Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**LIN, RONG-HWA;  
LIN, LEEWEN;  
LIN, SHIH-YAO y  
LEE, SHU-HUA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 718 952 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que reconocen un epítipo que contiene carbohidratos en CD-43 y CEA expresados en células cancerosas y métodos que los usan

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo que contiene carbohidratos en CD43 y antígeno carcinoembrionario (CEA) expresados en células tumorales o cancerosas no hematopoyéticas. Estos anticuerpos tienen la propiedad de inducir la muerte celular (por ejemplo, apoptosis) en estos tumores no hematopoyéticos o células cancerosas en ausencia de conjugación de citotoxinas y función efectora inmune. Estos anticuerpos monoclonales son útiles como agentes de diagnóstico y terapéuticos.

10

**Antecedentes de la invención**

15

CD43 (también llamado sialoforina o leucosialina), una molécula fuertemente sialilada se expresa en niveles altos en la mayoría de los leucocitos humanos, incluidos todos los linfocitos T y las plaquetas, con un peso molecular que varía de 115.000 a 135.000. La expresión de CD43 es defectuosa en los linfocitos T de los varones con el síndrome de Wiskott-Aldrich, un trastorno de inmunodeficiencia recesiva ligada al cromosoma X (Remold-O'Donnell et al. (1987) *Blood* 70(l):104-9; Remold-O'Donnell et al. (1984) *J. Exp. Med.* 159: 1705-23).

20

Los estudios funcionales demostraron que el anticuerpo monoclonal anti-CD43 estimula la proliferación de linfocitos T de sangre periférica (Mentzer et al. (1987) *J. Exp. Med.* 1;165 (5):1383-92; Park et al. (1991) *Nature*, 350: 706-9) y la activación de monocitos (Nong et al. (1989) *J. Exp. Med.* :170(l):259-67). Un anticuerpo monoclonal anti-CD43 L11 bloquea la unión de los linfocitos T a los ganglios linfáticos y las placas de Peyer HEV. El anticuerpo L11 inhibe la extravasación de linfocitos T de la sangre en tejidos linfoides secundarios organizados (McEvoy et al. (1997) *J. Exp. Med.* 185: 1493-8). El anticuerpo monoclonal que reconoce la molécula CD43 induce la apoptosis de células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea negativas para el marcador de linaje (HPC) que expresan CD34 a una alta densidad (Bazil et al. (1996) *Blood*, 87(4): 1272-81.) y de linfocitos T linfoblastoides humanos (Brown et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 27686-95). Estudios recientes indicaron además que CD43 funciona como un ligando para E-selectina en linfocitos T humanos (Matsumoto et al. (2005) *J. Immunol.* 175: 8042-50; Fuhlbrigge et al. (2006) *Blood*, 107: 1421-6).

25

30

De forma interesante, los científicos también han descubierto que ciertas células tumorales no hematopoyéticas, especialmente adenocarcinomas colorrectales, expresan moléculas de CD43 en la superficie celular. Santamaria et al. (1996) *Cancer Research*, 56:3526-9; Baeckstrom et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 13688-92; Baeckstrom et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 11503-9; Sikut et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 612-6. Se ha demostrado que los glucanos en CD43 expresados en una línea celular de carcinoma de colon (COLO 205) son diferentes de los de los leucocitos CD43 (Baeckstrom et al. (1997) *J. Biol. Chem.*272:11503-9). Aunque se ha sugerido que la sobreexpresión de CD43 produce la activación de la proteína supresora tumoral p53 (Kadaja et al. (2004) *Oncogene* 23:2523-30) y suprime una subpoblación de genes diana NF-kappaB, en parte a través de la inhibición de la actividad transcripcional de p65 (Laos et al. (2006) *Int. J. Oncol.* 28: 695-704), todavía falta la evidencia directa que muestra el papel causal de CD43 en la tumorigénesis de colon. El uso de un anticuerpo anti-CD43 convencional como agente terapéutico para células tumorales no hematopoyéticas no es práctico debido a su fuerte unión a linfocitos T tumorales e inmunitarios. Fernandez-Rodriguez et al. (2002) *Tumor Biol.* 23, 193-201 describe dos anticuerpos que reaccionan con el polipéptido CD43 en una línea celular de adenocarcinoma de colon y en células Jurkat. Santamaria et al. (1996) *Cancer Research* 56, 3526-3529 describen anticuerpos anti-CD43 que reaccionan con células tumorales no hematopoyéticas y también con leucocitos. Sikut et al. (1999) *Int. J. Cancer* 82, 52-58 y Pimenidou et al. (2004) *Oncology Reports* 11, 327-331 describen anticuerpos que reaccionan con el polipéptido CD43. Baekstrom et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 13688-13692 describen anticuerpos relacionados con la expresión de una sialoglicoproteína asociada a leucocitos CD43 por una línea celular de carcinoma de colon. Sigue habiendo una necesidad de generar anticuerpos que se unan específicamente a un CD43 expresado en células tumorales o cancerosas no hematopoyéticas, pero no se unen a un CD43 expresado en leucocitos u otras células de origen hematopoyético. Estos anticuerpos pueden ser útiles como agentes terapéuticos para tratar el cáncer no hematopoyético que expresa CD43.

35

40

45

50

55

El CEA se expresa normalmente en diversos tejidos epiteliales glandulares (tal como los tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital), donde parece estar localizado en la superficie apical de las células (Hammarstrom, S. (1999) *Semin. Cancer Biol.* 9: 67-81). En tumores derivados de estos tejidos, hay un nivel creciente de expresión de CEA que se extiende desde el dominio de la membrana apical a toda la superficie celular, junto con la secreción de la proteína en la sangre (Hammarstrom, S. (1999) *Semin. Cancer Biol.* 9: 67-81). La expresión excesiva de CEA se observó en muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y cáncer de tiroides. Por lo tanto, el CEA se ha utilizado como marcador tumoral y los ensayos inmunológicos para medir la elevada cantidad de CEA en la sangre de los pacientes con cáncer se han utilizado clínicamente durante mucho tiempo en el pronóstico y el tratamiento de los cánceres (Gold P, et al. (1965) *J. Expl. Med.* 122:467-81; Chevinsky, A. H. (1991) *Semin. Surg. Oncol.* 7, 162-166; Shively, J.

60

65

E. et al., (1985) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2, 355-399).

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

### Breve resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona nuevos anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo en CD43 y CEA expresados por una célula cancerosa no hematopoyética, pero no se unen específicamente a un CD43 expresado por un leucocito (por ejemplo, linfocitos T periféricos humanos) o una célula Jurkat (una célula de leucemia linfoblástica). El epítipo al que los anticuerpos se unen y comprende un carbohidrato y estos anticuerpos son capaces de inducir la muerte celular en estas células cancerosas no hematopoyéticas en ausencia de conjugación de citotoxinas con los anticuerpos y la función efectora inmune, tal como se define en las reivindicaciones.

Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo, anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en CD43 y/o CEA expresado por una célula cancerosa no hematopoyética, pero no se une específicamente a un CD43 expresado por un leucocito o por una célula Jurkat, y es capaz de inducir la apoptosis de la célula cancerosa no hematopoyética después de la unión al epítipo expresado en la superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética en ausencia de conjugación con citotoxina y función efectora inmune, en el que el epítipo comprende un carbohidrato y la unión del anticuerpo al epítipo es inhibida por un carbohidrato que comprende una estructura Le<sup>a</sup>, una estructura de Le<sup>a</sup>-lactosa, una estructura LNDFH II, o una estructura LNT como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el epítipo al que se une el anticuerpo es sensible a la fucosa.

La célula cancerosa no hematopoyética incluye células de cáncer colorrectal y cáncer gástrico.

El anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo murino, humano, humanizado o quimérico.

En algunas realizaciones, el anticuerpo descrito en el presente documento, al unirse al epítipo expresado en la superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética, reduce el número de células cancerosas y/o inhibe el crecimiento o la proliferación de las células cancerosas. Por ejemplo, la reducción en el número de células o la inhibición del crecimiento celular en presencia del anticuerpo es de al menos cualquiera de aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 75 % o mayor en comparación con el número de células o el crecimiento celular en ausencia del anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo descrito en el presente documento compite con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, para unirse al epítipo presente en la superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética.

En algunas realizaciones, el anticuerpo descrito en el presente documento compite con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, para unirse al epítipo presente en la superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética.

En algunas realizaciones, el anticuerpo descrito en el presente documento compite con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, para la unión al epítipo expresado en la superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y la región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 y una región variable

de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena ligera que comprende tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona vectores (tal como vectores de expresión) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos o vectores descritos en el presente documento como se define en las reivindicaciones.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento como se define en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones, los anticuerpos están ligados a un agente que es una citotoxina.

30 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, los anticuerpos están ligados a una citotoxina.

35 En algunas realizaciones, la composición puede comprender más de un anticuerpo de la invención, o un anticuerpo de la invención con uno o más anticuerpos anticáncer u otros agentes anticancerosos.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo descrito en el presente documento para su uso en cáncer no hematopoyético en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo descrito en el presente documento, en el que el anticuerpo se une a las células cancerosas en el individuo como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer colorrectal, pancreático, gástrico o pulmonar.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo descrito en el presente documento para su uso en métodos para tratar el cáncer no hematopoyético en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad de un anticuerpo descrito en el presente documento y una cantidad de otro agente contra el cáncer, en el que el anticuerpo se une a las células cancerosas en el individuo, y por lo que el anticuerpo y el agente contra el cáncer en conjunto proporcionan un tratamiento eficaz del cáncer en el individuo como se define en las reivindicaciones.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona kits para tratar el cáncer no hematopoyético en un individuo que comprende un anticuerpo descrito e instrucciones para administrar el anticuerpo al individuo para tratar el cáncer como se define en las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

55 La figura 1 muestra los resultados de la identificación de la proteína diana de 5F1. La proteína en el eluato de la columna de inmunoafinidad 5F1 del lisado COLO 205 (carriles 1 y 3) o el lisado COLO 320 (carriles 2 y 4) se inmunotransfirió con un anticuerpo comercial anti-CD43 AF2038 (carriles 1 y 2) o anticuerpo 5F1 (carriles 3 y 4).  
 60 La Figura 2A muestra los resultados del análisis citométrico de flujo de la unión del anticuerpo 5F1 a tres líneas celulares de cáncer: células de cáncer colorrectal (COLO 205 y DLD-1) y células de cáncer gástrico (NCI-N87).  
 La Figura 2B muestra los resultados del análisis citométrico de flujo de la unión del anticuerpo 5F1 a las células endoteliales normales (HUVEC), células pulmonares normales (embrionarias) (MRC-5), células epiteliales de la glándula mamaria normales (MCF-10A), células colorrectales normales (CCD841-CoN), linfocitos T activados (activados durante siete días) o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) normales.  
 65 La Figura 3 muestra el enriquecimiento medio de los nucleosomas en el citoplasma de las células COLO 205 después de la incubación en presencia del anticuerpo 5F1 o 9E10 (un anticuerpo anti-myc), o medio de control

durante 6, 24 y 48 horas.

La Figura 4 muestra los resultados del crecimiento celular de COLO 205 medido por el ensayo WST-1 después de la incubación con anticuerpo 5F1, 9E10 o azida *in vitro* durante 72 horas.

La Figura 5 muestra los resultados del crecimiento celular medido por el ensayo WST-1. Las células de carcinoma colorrectal COLO 205 y la línea celular colorrectal normal CCD841-CoN se dejaron sin tratamiento o se incubaron con 9E10, 5F1 (denominado "m133-5F1"), o azida al 0,5 %.

La Figura 6 muestra los resultados de la tinción con MTT de células COLO 205 después de la incubación con varias concentraciones de 5F1 (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ug/ml), 9E10 (64 ug/ml) o azida al 0,5 %.

La Figura 7 muestra los efectos *in vivo* (sobre el tamaño del tumor) del anticuerpo 5F1 (también denominado "m133-5F1") en tumores COLO 205 humanos en ratones SCID. Se inyectó el anticuerpo 5F1 (a 500 µg/inyección), o el anticuerpo de control 9E10 (a 500 µg/inyección), o PBS (sin tratar) los días 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 17.

La Figura 8 muestra los efectos *in vivo* (sobre el tamaño del tumor) del anticuerpo 5F1 con fármacos químicos 5FU/IV en tumores COLO 205 humanos en ratones SCID. Se inyectó 5FU/IV por vía intravenosa cada dos días con cuatro dosis de 25 mg/kg a la semana después de la inoculación de células COLO 205. El anticuerpo 5F1 se inyectó por vía intraperitoneal a 0, 6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg y 25 mg/kg dos veces a la semana durante 3 semanas después de 7 días de implante de tumor.

La Figura 9A muestra los resultados de citometría de flujo de la unión del anticuerpo quimérico 5F1 a la célula COLO 205. Las Figuras 9B muestran el porcentaje de células positivas para anexina V y PI después de la incubación de células COLO 205 con medio de control (sin tratar), azida sódica (al 0,5 %), anticuerpo de ratón 5F1 (m5F1, 2-32 µg/ml), o anticuerpo quimérico 5F1 (c5F1, 2-32 µg/ml).

La Figura 10 muestra la tinción de células COLO 205 y NCI-N87 para la muerte celular apoptótica después de la incubación con diversos anticuerpos. Las células COLO 205 y NCI-N87 se incubaron durante la noche con el control, 9E10 (30 ug/ml), m5F1 (10 ug/ml) o m5F1 (30 ug/ml). A continuación, las células se tiñeron con YO-PRO-1 (A) o se combinaron Anexina-V & PI (B). El porcentaje de tinción para cada condición se muestra en el gráfico de barras.

La Figura 11 muestra que m5F1 se une al CEA humano recombinante (rhCEA) expresado en células COLO 205, pero no reconoce el rhCEA expresado en células COS-7. En la Figura 11A, los lisados celulares de COLO 205 que expresan CEA humano marcado con el marcador se inmunoprecipitaron con anticuerpo M2 anti-marcador, las proteínas inmunoprecipitadas se pasaron por SDS-PAGE y después se transfirieron a papel de NC. El papel NC se incubó con anti-marcador M2, m5F1, 51-41, 138-10, o CEA/Ab-3 como se indica. En la Figura 11B, los lisados celulares de células COS-7 que expresaban CEA (+) humano marcado con el marcador o células COS-7 (-) que no expresaban CEA se inmunoprecipitaron con anticuerpo M2 anti-marcador, las proteínas inmunoprecipitadas se pasaron por SDS-PAGE y después se transfirieron a papel de NC. El papel NC se incubó con anti-marcador M2, m5F1, o CEA/Ab-3 como se indica.

La Figura 12 muestra que m5F1 se une a CD43 recombinante (rhCD43) expresado en células COLO 205, pero no reconoce rhCD43 expresado en células COS-7. En la Figura 12A, el CD43 soluble expresado por células COLO 205 purificadas con perlas de proteína A Sepharose se procesaron en SDS-PAGE y se transfirieron a papel NC, y el papel NC se sometió a transferencia Western con anticuerpo m5F1, 51-14 o 138-10. En la Figura 12B, los lisados celulares de células COS-7 transfectadas con hCD43, hCD43/myc-His o las células no transfectadas se pasaron en SDS-PAGE y se transfirieron a papel NC, y el papel NC se sometió a transferencia Western con anti-CD43 (MEM59) (panel izquierdo) o m5F1 (panel derecho).

La figura 13 muestra que el anticuerpo m5F1 reconoce un glicopéptido dependiente de fucosa. El rhCEA expresado por las células COLO 205 se trató con 0, 0,01, 0,03, 0,1 mU de  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  (2,3,4) -fucosidasa. Tras el tratamiento, las proteínas se pasaron por SDS-PAGE y luego se tiñeron con azul de Coomassie (panel derecho) o transferencia Western con anticuerpo m5F1.

La Figura 14 muestra la estructura de Lewis<sup>a</sup>-Lactosa (Le<sup>a</sup>-lactosa), Lewis<sup>b</sup>-lactosa (Le<sup>b</sup>-lactosa), Lewis<sup>x</sup>-lactosa (Le<sup>x</sup>-lactosa), lactosa, Lewis<sup>y</sup> (Le<sup>y</sup>), Sialil-Lewis<sup>x</sup> (Sialil-Le<sup>x</sup>), Lewis<sup>a</sup> (Le<sup>a</sup>), Lacto-N-tetraosa (LNT) y Lacto-N-difucohexaosa II (LNDFH II).

La Figura 15 muestra los resultados de los ensayos de inhibición de la unión añadiendo oligosacáridos para competir con la unión de m5F1, 138-10 y 51-41 a las células COLO 205. Oligosacáridos (LNDFH II, LNT, sLe (x), Le(y), lactosa, Le(x)-lactosa, Le(b)-lactosa, Le(a)-lactosa o Le(a); cada uno a 1 mM) se añadieron a diferentes pocillos que contenían  $2 \times 10^5$  células COLO 205, seguido de la adición de los anticuerpos (138-10, 51-41 o m5F1) o ningún anticuerpo como control. La unión de los anticuerpos a las células COLO 205 se midió mediante análisis de citometría de flujo. La inhibición de la unión de los oligosacáridos para cada anticuerpo se muestra como el porcentaje de inhibición determinado por el valor medio de la fluorescencia en la Figura.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse de forma específica a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se utiliza en el presente documento, el término abarca no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión

que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de la misma), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. En función por secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstas pueden además dividirse en "subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El anticuerpo de la presente divulgación pretende además incluir moléculas biespecíficas, multiespecíficas, de cadena simple, y quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido conferido por al menos una región CDR del anticuerpo. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos de dominio único que son el dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo o el dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo. Holt et al., *Trends Biotechnol.* 21:484-490, 2003. En la técnica también se conocen procedimientos para hacer anticuerpos de dominio que comprenden el dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo o el dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo, que contiene tres de las seis regiones determinantes de complementariedad de origen natural de un anticuerpo. Véanse, por ejemplo, Muyldermans, *Rev. Mol. Biotechnol.* 74:277-302, 2001.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son generalmente altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden realizarse por el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495, o puede hacerse mediante procedimientos de ADN recombinante como los descritos en las patentes de EE.UU. N.º 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., 1990, *Nature*, 348: 552-554, por ejemplo.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que tiene una región variable o parte de una región variable de una primera especie y una región constante de una segunda especie. Un anticuerpo quimérico intacto comprende dos copias de una cadena ligera quimérica y dos copias de una cadena pesada quimérica. La producción de anticuerpos quiméricos es conocida en la técnica (Cabilly y col., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3273-3277; Harlow y Lane (1988), *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory). Normalmente, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable de ambas cadenas ligeras y pesadas imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otro. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que, por ejemplo, las regiones variables pueden derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas utilizando hibridomas o linfocitos B fácilmente disponibles de organismos huésped no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de ser fácil de preparar, y la especificidad no se ve afectada por su origen, la región constante que es humana tiene menos probabilidades de provocar una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo en particular.

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

Tal como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a material que es al menos un 50 % puro (es decir, está libre de contaminantes), más preferentemente al menos un 90 % puro, más preferentemente al menos un 95 % puro, más preferentemente al menos un 98 % puro, más preferentemente al menos un 99 % puro.

Tal como se utiliza en el presente documento, los anticuerpos "humanizados" se refieren a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina, o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen al antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, o conejo que tiene la especificidad deseada, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, Los residuos de la región de la estructura Fv (FR) de la inmunoglobulina

humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Adicionalmente, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada ni en las secuencias marco, pero se incluyen para refinar y optimizar aún más el rendimiento de anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en la que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una parte de una región o dominio (Fc) de inmunoglobulina constante, normalmente de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden tener regiones Fc modificadas como se describe en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que se han alterado con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

Tal como se utiliza en el presente documento, "Anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para fabricar anticuerpos humanos conocidos en la técnica o divulgados en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humana o al menos un polipéptido de cadena ligera humana. Un ejemplo de este tipo es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, Nature Biotechnology, 14: 309-314; Sheets y col., 1998, PNAS, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Los anticuerpos humanos también pueden producirse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Este enfoque se describe en las patentes de EE.UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016. Como alternativa, el anticuerpo humano puede prepararse inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véanse, por ejemplo, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner y col., 1991, J. Immunol., 147 (I):86-95; y la patente de EE.UU. n.º 5.750.373.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, en solitario o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten en cuatro regiones marco (FR) conectadas por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas muy cerca de las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Hay al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948.). Tal como se utiliza en el presente documento, una CDR puede referirse a las CDR definidas por un enfoque o por una combinación de ambos enfoques.

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

Como se usa en el presente documento, "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan lisis de la célula diana. La actividad ADCC de una molécula de interés puede evaluarse utilizando un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células NK. Como alternativa o además, La actividad de ADCC de la molécula de interés puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al., 1998, PNAS (USA), 95: 652-656.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del

complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) con una molécula (por ejemplo un anticuerpo) que forma un complejo con un antígeno análogo. Para evaluar la activación de complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

5 Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, dado que los polipéptidos se basan en un anticuerpo, los polipéptidos pueden aparecer como cadenas simples o cadenas asociadas.

"Polinucleótido", o "ácido nucleico", como se usa de manera indistinta en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, pueden realizarse modificaciones de la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "capuchones", la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas del o los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes en los azúcares puede ser reemplazado, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar, o activados para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos. El OH terminal 5' y 3' puede estar fosforilado o sustituido con aminas o restos de grupos de protección orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son normalmente conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares  $\alpha$ -anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como ribósido de metilo. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de unión alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S("tioato"), P(S)S("dilitioato"), (O)NR<sub>2</sub>("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH<sub>2</sub>("formacetal"), en el que cada R o R' son independientemente H o alquilo (C1-20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

Tal como se utiliza en el presente documento, "vector" significa una construcción, que es capaz de liberar, y preferentemente expresar, uno o más genes o secuencia (s) de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudos, plásmidos, cósmidos o vectores fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

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

Tal como se utiliza en el presente documento, una "dosis eficaz" o "cantidad eficaz" de medicamento, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como la eliminación o la reducción del riesgo, la disminución de la gravedad, o el retraso del inicio de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o

deseados incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad, reducir la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, potenciar el efecto de otra medicación tal como dirigir, o retrasar la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia. En el caso de cáncer o tumor, una cantidad eficaz del medicamento puede tener el efecto de reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los propósitos de esta divulgación, una dosis efectiva de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para llevar a cabo el tratamiento profiláctico o terapéutico tanto directa como indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede conseguirse o no junto con otro fármaco, compuesto, o composición farmacéutica. Por lo tanto, se puede considerar una "dosis eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos y se puede considerar que un único agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, puede darse o se consigue un resultado deseable.

Tal como se utiliza en el presente documento, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Por tanto, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de otra modalidad de tratamiento al individuo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" es una solución para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo y, preferentemente, resultados clínicos. Para los fines de esta divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: reducir la proliferación de (o destruir) células cancerosas, disminuir los síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad, reducir la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

Tal como se utiliza en el presente documento, "retrasar el desarrollo de una enfermedad" significa diferir, impedir, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (como el cáncer). Este retraso puede ser de diferentes períodos de tiempo, dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del individuo que se trate. Como es evidente para un experto en la materia, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, incluir la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer en etapa tardía, tal como el desarrollo de metástasis, puede retrasarse.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "reconoce específicamente" o "se une específicamente" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, como la atracción o unión entre un objetivo y un anticuerpo, que es determinante de la presencia del objetivo en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluidas las moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferentemente a un epítipo es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que la que se une a otros epítipos de los epítipos objetivo o no objetivo. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une de manera específica o preferente a un primer objetivo puede o no unirse de manera específica o preferente a un segundo objetivo. Por tanto, "unión específica" o "unión preferente" no necesariamente requieren (aunque puede incluir) unión exclusiva. Un anticuerpo que se une específicamente a un objetivo puede tener una constante de asociación de al menos aproximadamente  $10^3\text{M}^{-1}$  o  $10^4\text{M}^{-1}$ , en ocasiones aproximadamente  $10^5\text{M}^{-1}$  o  $10^6\text{M}^{-1}$ , en otros casos aproximadamente  $10^6\text{M}^{-1}$  o  $10^7\text{M}^{-1}$ , de aproximadamente  $10^8\text{M}^{-1}$  a  $10^9\text{M}^{-1}$  o de aproximadamente  $10^{10}\text{M}^{-1}$  a  $10^{11}\text{M}^{-1}$  o mayor. Se pueden usar diversos formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véanse, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de los formatos de inmunoensayo y las condiciones que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "cáncer" "tumor," "canceroso," y "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, incluyendo adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma y sarcoma. Entre los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamocelular de pulmón, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, glioma, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, tal como el carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o

uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer de esófago y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

- 5 Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "uno", y "el" o "la", incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a un "anticuerpo" es una referencia de uno a muchos anticuerpos, tales como cantidades molares, e incluyen equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.
- 10 Se entiende que aspectos y variaciones de la divulgación descrita en el presente documento incluyen "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y variaciones.

Anticuerpos y polipéptidos que se unen específicamente a un epítipo de carbohidratos en CD43 y CEA expresados en células cancerosas no hematopoyéticas

- 15 La divulgación proporciona anticuerpos aislados y polipéptidos derivados de los anticuerpos, que se unen específicamente a un epítipo en CD43 y/o CEA expresado por células cancerosas no hematopoyéticas, pero no se unen específicamente a un CD43 expresado por un leucocito (como un linfocito T periférico) o una célula Jurkat. Los anticuerpos y polipéptidos pueden además tener una o más de las siguientes características: (a) la unión del anticuerpo o el polipéptido al epítipo se reduce si la molécula que comprende el epítipo se trata con  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  (2,3,4) - fucosidasa; (b) la unión del anticuerpo o el polipéptido al epítipo es inhibida por un carbohidrato que comprende una estructura Le<sup>a</sup>, una estructura de Le<sup>a</sup>-lactosa, una estructura LNDFH II y/o una estructura LNT; (c) inducen la muerte de la célula cancerosa no hematopoyética (por ejemplo, a través de la apoptosis) después de unirse al epítipo expresado en la superficie celular de la célula cancerosa en ausencia de conjugación de citotoxinas y función efectora inmune; (d) inhiben el crecimiento o la proliferación celular de la célula cancerosa no hematopoyética después de la unión al epítipo expresado en la superficie celular de la célula cancerosa; y (e) tratan o previenen el
- 20 anticuerpo o el polipéptido al epítipo se reduce si la molécula que comprende el epítipo se trata con  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  (2,3,4) - fucosidasa; (b) la unión del anticuerpo o el polipéptido al epítipo es inhibida por un carbohidrato que comprende una estructura Le<sup>a</sup>, una estructura de Le<sup>a</sup>-lactosa, una estructura LNDFH II y/o una estructura LNT; (c) inducen la muerte de la célula cancerosa no hematopoyética (por ejemplo, a través de la apoptosis) después de unirse al epítipo expresado en la superficie celular de la célula cancerosa en ausencia de conjugación de citotoxinas y función efectora inmune; (d) inhiben el crecimiento o la proliferación celular de la célula cancerosa no hematopoyética después de la unión al epítipo expresado en la superficie celular de la célula cancerosa; y (e) tratan o previenen el
- 25 cáncer no hematopoyético que expresa el epítipo en la superficie celular, tal como cáncer colorrectal y cáncer gástrico, en un individuo.

- 30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inhibición" incluye inhibición parcial y completa. Por ejemplo, la unión del anticuerpo o el polipéptido al epítipo en CD43 y CEA se inhibe en al menos aproximadamente un 20%, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o al menos aproximadamente un 90% por un carbohidrato que comprende una estructura de Le<sup>a</sup>, una estructura de Le<sup>a</sup>-lactosa, una estructura LNDFH II o una estructura LNT. La unión del anticuerpo al epítipo puede ser inhibida por la competencia directa o por otros mecanismos.
- 35 por la competencia directa o por otros mecanismos.

Los ejemplos de células cancerosas no hematopoyéticas que expresan el epítipo incluyen, pero sin limitación, células de cáncer colorrectal (tal como COLO 205 y DLD-1) y células de cáncer gástrico (tal como NCI-N87).

- 40 Los anticuerpos y polipéptidos pueden reconocer un dominio extracelular de un CD43 presente en una célula cancerosa no hematopoyética, pero no se une a un dominio extracelular de un CD43 de leucocitos (por ejemplo, un linfocito T periférico) o un dominio extracelular de CD43 expresado en una célula Jurkat (una célula de leucemia linfoblástide). En algunas realizaciones, los nuevos anticuerpos o polipéptidos no se unen específicamente a un CD43 expresado por una célula de origen hematopoyético.
- 45 CD43 expresado por una célula de origen hematopoyético.

Los anticuerpos pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida. Los anticuerpos pueden ser murinos, rata, camello, humanos o cualquier otro origen (incluidos los anticuerpos humanizados).

50 Los anticuerpos pueden ser murinos, rata, camello, humanos o cualquier otro origen (incluidos los anticuerpos humanizados).

- 55 La afinidad de unión del polipéptido (incluido el anticuerpo) a CD43 o CEA puede ser menor que cualquiera de aproximadamente 500 nM, aproximadamente 400 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM o aproximadamente 50 pM. Como es bien sabido en la técnica, la afinidad de unión se puede expresar como la K<sub>D</sub>, o constante de disociación y una afinidad de unión aumentada corresponde a una K<sub>D</sub> menor. Una forma de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos a CD43 o CEA es midiendo la afinidad de unión de los fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede ser escindido con papaína o expresado de forma recombinante. La afinidad de un fragmento Fab de un anticuerpo se puede determinar por resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón BIAcore3000™ (SPR), BIAcore, INC, Piscaway NJ) y ELISA. Se obtienen las constantes de asociación cinética (k<sub>on</sub>) y las constantes de disociación (k<sub>off</sub>) (generalmente medidos a 25 °C); y los valores de la constante de disociación en equilibrio (K<sub>D</sub>) se calculan como k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>.
- 60 CEA es midiendo la afinidad de unión de los fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede ser escindido con papaína o expresado de forma recombinante. La afinidad de un fragmento Fab de un anticuerpo se puede determinar por resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón BIAcore3000™ (SPR), BIAcore, INC, Piscaway NJ) y ELISA. Se obtienen las constantes de asociación cinética (k<sub>on</sub>) y las constantes de disociación (k<sub>off</sub>) (generalmente medidos a 25 °C); y los valores de la constante de disociación en equilibrio (K<sub>D</sub>) se calculan como k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>.
- 65 a 25 °C); y los valores de la constante de disociación en equilibrio (K<sub>D</sub>) se calculan como k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>.

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

En algunas realizaciones, los anticuerpos y los polipéptidos son capaces de inducir la muerte celular solo, por ejemplo a través de apoptosis, después de la unión del epítipo expresado en la superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética. El término "inducir la muerte celular" como se usa en el presente documento, significa que los anticuerpos o polipéptidos, pueden interactuar directamente con una molécula expresada en la superficie celular y la unión/interacción sola es suficiente para inducir la muerte celular en las células sin la ayuda de otros factores tales como la conjugación de citotoxinas u otras funciones efectoras inmunes, es decir, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o fagocitosis.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "apoptosis" se refiere al proceso dirigido por genes de la destrucción de células intracelulares. La apoptosis es distinta de la necrosis; incluye la interrupción del citoesqueleto, encogimiento y condensación del citoplasma, expresión de fosfatidilserina en la superficie externa de la membrana celular y formación de vesículas, dando como resultado la formación de vesículas unidas a la membrana celular o cuerpos apoptóticos. El proceso también se conoce como "muerte celular programada". Durante la apoptosis, se observan fenómenos característicos tales como superficies celulares curvadas, condensación de la cromatina nuclear, fragmentación del ADN cromosómico y pérdida de la función mitocondrial. Se pueden usar varias tecnologías conocidas para detectar la apoptosis, tales como células de tinción con Anexina V, yoduro de propidio, ensayo de fragmentación de ADN y YO-PRO-1 (Invitrogen).

Los métodos para detectar la muerte celular (tales como apoptosis) incluyen, pero sin limitación, detección de morfología, fragmentación del ADN, actividad enzimática y degradación de polipéptidos, etc. Véase Siman et al., Patente de los Estados Unidos n.º 6.048.703; Martin y Green (1995), *Cell*, 82: 349-52; Thomberry y Lazebnik (1998), *Science*, 281: 1312-6; Zou et al., patente de los Estados Unidos n.º 6.291.643; Scovassi y Poirier (1999), *Mol. Cell Biochem.*, 199: 125-37; Wyllie et al. (1980), *Int. Rev. Cytol*, 68: 251-306; Belhocine et al. (2004), *Technol. Cancer Res. Treat.*, 3(1):23-32.

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

En algunas realizaciones, los anticuerpos y polipéptidos compiten con el anticuerpo 5F1, 138-10 o 51-41, para la unión al epítipo expresado en la superficie celular de la célula cancerosa. En algunas realizaciones, los anticuerpos o polipéptidos que se unen a un epítipo en CD43 o CEA al que se une al menos uno de los anticuerpos 5F1, 138-10 y 51-41.

Se pueden usar ensayos de competición para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo epítipo reconociendo epítopos idénticos o estéricamente superpuestos o si un anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión de otro anticuerpo al antígeno. Estos ensayos son conocidos en la técnica y se describen con detalle en los Ejemplos. Normalmente, las células que expresan antígeno o antígeno se inmovilizan en una placa de múltiples pocillos y se mide la capacidad de los anticuerpos no marcados para bloquear la unión de los anticuerpos marcados. Los marcadores comunes para tales ensayos de competición son marcadores radiactivos o marcadores radioactivos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo 5F1 o un anticuerpo derivado de 5F1. Las secuencias variables de cadena pesada y cadena ligera de 5F1 se exponen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO:2, respectivamente. La divulgación proporciona un anticuerpo o un polipéptido que comprende un fragmento o una región del anticuerpo 5F1. En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo 5F1. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo 5F1. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 5F1. En otra realización más, el fragmento contiene una, dos o tres CDR de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 5F1. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado de 5F1, tal como h5F1 que comprende la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO:7 y la región variable de la cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, la una o más CDR derivadas del anticuerpo 5F1 son al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos

aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad con al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis CDR de 5F1.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo 138-10 o un anticuerpo derivado de 138-10. Las secuencias variables de cadena pesada y cadena ligera de 138-10 se exponen en la SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, respectivamente. La divulgación proporciona un anticuerpo o un polipéptido que comprende un fragmento o una región del anticuerpo 138 -10. En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo 138 -10. En otra  
10 realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo 138-10. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 138 -10. En otra realización más, el fragmento contiene una, dos o tres CDR de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 138 -10. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado de 138-10. En algunas  
15 realizaciones, las una o más CDR derivadas del anticuerpo 138-10 son al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad con al menos una, al menos  
20 dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis CDR de 138-10.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo 51-41 o un anticuerpo derivado de 51-41. Las secuencias variables de cadena pesada y cadena ligera de 51-41 se exponen en la SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, respectivamente. La divulgación proporciona un anticuerpo o un polipéptido que comprende un fragmento o una  
25 región del anticuerpo 51 -41. En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo 51 -41. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo 51-41. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 51 -41. En otra realización más, el fragmento contiene una, dos o tres CDR de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo 51 -41. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado de 51-41. En algunas realizaciones, las una o  
30 más CDR derivadas del anticuerpo 51-41 son al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 86 %, al menos aproximadamente un 87 %, al menos aproximadamente un 88 %, al menos aproximadamente un 89 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98  
35 % o al menos aproximadamente un 99 % de identidad con al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis CDR de 51-41.

En algunas realizaciones, la CDR es una CDR de Kabat. En otras realizaciones, la CDR es una CDR de Chothia. En otras realizaciones, la CDR es una combinación de una CDR de Kabat y una de Chothia (también denominada "CDR combinada" o "CDR extendida"). En otras palabras, para cualquier realización dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de Kabat, Chothia, y/o combinadas.  
40

Los métodos para producir anticuerpos y polipéptidos derivados de los anticuerpos son conocidos en la técnica y se divulgan en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos bien  
45 establecidos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando tecnología de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975), *Nature*, 256:495. En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado, se inmuniza normalmente con un agente inmunizante (por ejemplo, una célula cancerosa que expresa CD43 o CEA, CD43 o CEA (incluido el dominio extracelular y sus fragmentos expresados por la célula cancerosa) que pueden purificarse utilizando los anticuerpos descritos en el presente  
50 documento, o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos N'-Trp-Pro-Ile-C 'en el extremo N del polipéptido) para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tales como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*,  
55 Academic Press, (1986) pág. 59-1031). Las líneas celulares inmortalizadas suelen ser células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de roedor, conejo, de origen bovino y humano. Normalmente, se emplean líneas de células de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contenga, preferentemente, una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de células inmortalizadas no fusionadas, células inmortalizadas. Por ejemplo, si las células precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas  
60 sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferentes son aquellas que se fusionan de forma eficaz, mantienen estable el nivel de expresión elevado del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas son las líneas de mieloma murino, que  
65

pueden obtenerse, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, y la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromioma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. (1984), 133:3001; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pág. 51-63).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede analizarse después para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales. El anticuerpo puede explorarse para tener una unión específica al epítipo en CD-43 o CEA expresado por el cáncer no hematopoyético o células tumorales, pero no hay unión específica a CD43 que exprese leucocitos, células Jurkat y/u otras células que expresan CD43 de origen hematopoyético. Las células cancerosas o el dominio extracelular (incluidos los fragmentos de los mismos) que contienen el epítipo se pueden usar para la detección selectiva. Por ejemplo, El CEA-N-A2 expresado por las células COLO 205 descritas en el Ejemplo 10 puede usarse para la detección selectiva.

La línea celular Jurkat es una célula de leucemia linfoblatoide y la estableció a partir de la sangre periférica de un niño de 14 años Schneider et al. Schneider et al., Int. J. Cancer 19:621-626,1977. Varias líneas celulares Jurkat están disponibles comercialmente, por ejemplo, de la a Colección Americana de Cultivos Tipo (por ejemplo, ATCC TIB-152, ATCC TIB-153, ATCC CRL-2678).

Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o un enzimoimmunoanálisis de absorción (ELISA). En la materia se conocen dichas técnicas. Se puede determinar la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard (1980), *Anal. Biochem.*, 107:220.

Los anticuerpos identificados también pueden analizarse para determinar su capacidad para inducir la muerte celular (por ejemplo, apoptosis) y/o inhibir el crecimiento o la proliferación celular usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento.

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución límite y cultivar mediante métodos estándar (Goding, citado anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado de Dulbecco o el medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales pueden generarse cultivando células de hibridoma y los anticuerpos secretados por las células de hibridoma pueden aislarse o purificarse adicionalmente. Los anticuerpos pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o del fluido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos también se pueden hacer por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos números 4.816.567 y 6.331.415. Por ejemplo, El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislados, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación para los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) o mediante unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina. Dicho polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

En alguna realización, los anticuerpos se expresan a partir de dos vectores de expresión. El primer vector de expresión codifica una cadena pesada del anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humanizado), que comprende una primera parte que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y una segunda parte que codifica una región constante de la cadena pesada; del anticuerpo. En algunas realizaciones, la primera parte codifica una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:7. El segundo vector de expresión codifica una cadena pesada del anticuerpo, que comprende una primera parte que codifica una región variable de la cadena ligera del anticuerpo y una segunda parte que codifica una región constante de la cadena ligera del anticuerpo. En algunas realizaciones, la primera parte codifica una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO:8.

Como alternativa, los anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) se expresan a partir de un único vector de expresión. El vector de expresión único codifica tanto la cadena pesada como la cadena ligera de los anticuerpos. En algunas realizaciones, el vector de expresión comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7 y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8.

Normalmente, el vector de expresión tiene secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción que se derivan de especies compatibles con una célula huésped. Además, el vector normalmente porta un gen o genes específicos que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en células transformadas.

Se conoce una amplia variedad de sistemas de expresión de vectores huésped recombinantes para células eucariotas, que se pueden usar. Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el más utilizado entre los microorganismos eucariotas, aunque hay disponible una serie de otras cepas, tales como *Pichia pastoris*. Las líneas celulares derivadas de organismos multicelulares como Sp2/0 u ovario de hámster chino (CHO), que están disponibles en la ATCC, también se pueden utilizar como huésped. Los plásmidos de vectores típicos adecuados para transformaciones de células eucariotas son, por ejemplo, pSV2neo y pSV2gpt (ATCC), pSVL y pSVK3 (Pharmacia), y pBPV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.).

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

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona células huésped eucariotas que se transforman mediante vectores de expresión recombinantes que comprenden construcciones de ADN desveladas en el presente documento y que son capaces de expresar los anticuerpos o polipéptidos. En algunas realizaciones, las células huésped transformadas por lo tanto, comprenden al menos una construcción de ADN que comprende las secuencias de ADN de cadena ligera y pesada descritas en el presente documento, y secuencias reguladoras de transcripción y traducción que están colocadas en relación con las secuencias de ADN que codifican cadena ligera y pesada para dirigir la expresión de anticuerpos o polipéptidos.

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

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

La presente divulgación proporciona un método para producir los anticuerpos o polipéptidos, que comprende cultivar una célula huésped que comprende uno o varios vectores de expresión que codifican los anticuerpos o los polipéptidos, y recuperar los anticuerpos o polipéptidos del cultivo por medios bien conocidos para un experto en la materia.

Adicionalmente, los anticuerpos deseados pueden producirse en un animal transgénico. Se puede obtener un animal transgénico adecuado de acuerdo con métodos estándar que incluyen la microinyección en huevos de los vectores de expresión apropiados, transfiriendo los huevos a hembras pseudo-embarazadas y seleccionando un descendiente que exprese el anticuerpo deseado.

La presente divulgación proporciona anticuerpos quiméricos que reconocen específicamente el epítipo en CD43 y CEA expresados por una célula cancerosa. Por ejemplo, las regiones variables y constantes del anticuerpo quimérico son de especies separadas. En algunas realizaciones, las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la ligera son de los anticuerpos murinos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las regiones variables comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:1 y la ID NO:2. En algunas realizaciones, las regiones variables comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones, las regiones variables comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran en la SEQ ID NO:5 y la SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, las regiones constantes tanto de la cadena pesada como de la ligera son de anticuerpos humanos.

El anticuerpo quimérico se puede preparar mediante técnicas bien establecidas en la materia. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU n.º 6.808.901, la Patente de EE.UU n.º 6.652.852, la Patente de EE.UU n.º 6.329.508, patente de Estados Unidos n.º 6.120.767 y patente de Estados Unidos n.º 5.677.427. En general, el anticuerpo quimérico se

puede preparar mediante obtención de ADNc que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos, insertando los ADNc en un vector de expresión, que al ser introducido en las células huésped eucariotas, expresa el anticuerpo quimérico. Preferentemente, el vector de expresión porta una secuencia de cadena pesada o ligera constante funcionalmente completa, de modo que cualquier secuencia de cadena pesada o ligera variable se puede insertar fácilmente en el vector de expresión.

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

Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos pronosticada de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región marco del anticuerpo usar durante el proceso de humanización (3) las metodologías/técnicas de humanización reales y (4) la transfección y la expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; 6.180.370; y 6.548.640. Por ejemplo, la región constante puede diseñarse para parecerse más a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmune si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU n.º 5.997.867 y 5.866.692.

Es importante que los anticuerpos se humanicen con la retención de una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, se pueden preparar anticuerpos humanizados mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles habitualmente y son familiares para los expertos en la técnica. Se dispone de programas informáticos que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias de consenso e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como el aumento de la afinidad por el o los antígenos objetivo. En general, los residuos de CDR están directamente, y más sustancialmente, implicados en la influencia de la unión a antígeno. Los anticuerpos humanizados también pueden contener modificaciones en la región bisagra para mejorar una o más características del anticuerpo.

En otra alternativa, los anticuerpos pueden analizarse y fabricarse de forma recombinante mediante la tecnología de expresión en fagos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743 y 6.265.150; y Winter y col., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994). Como alternativa, la tecnología de expresión en fagos (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990)) se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína recubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos puede realizarse en diversos formatos; para una revisión, véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) aislaron una serie de diversos anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una velocidad alta (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán mayor afinidad y los linfocitos B que muestran inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican y se diferencian de manera preferente durante la exposición posterior al antígeno. Este proceso natural puede imitarse empleando la técnica conocida como "barajado de cadenas". Marks, et al., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)). En este método, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos mediante la expresión en fagos puede mejorarse reemplazando secuencialmente los genes de la región V de la cadena pesada y ligera con los repertorios de variantes naturales (repertorios) de los genes del dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de pM-nM. Una estrategia para hacer repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes (también conocida como "la madre de todas las bibliotecas") se ha descrito en Waterhouse et al.,

*Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993). El barajado de genes también se puede utilizar para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedores, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este método, que también se conoce como "impresión de epítipo", el gen del dominio V de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos de roedor obtenidos por la técnica de expresión en fagos se reemplaza por un repertorio de genes de dominio por un repertorio de genes del dominio V humano, creando quimeras de roedor-humano. La selección de resultados de antígeno en el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio funcional de unión a antígeno, es decir, el epítipo gobierna (imprime) la elección del compañero. Cuando el proceso se repite para reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la publicación PCT N.º WO 93/06213, publicada el 1 de abril de 1993). Al contrario que la humanización tradicional de anticuerpos de roedor mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de marco o CDR de origen roedor. Es evidente que aunque la discusión anterior se refiere a anticuerpos humanizados, los principios generales discutidos son aplicables a la personalización de anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano. Los anticuerpos no humanos que se unen específicamente a un antígeno se pueden usar para producir un anticuerpo completamente humano que se une a ese antígeno. Por ejemplo, el experto puede emplear una técnica de intercambio de cadenas, en el que la cadena pesada de un anticuerpo no humano se coexpresa con una biblioteca de expresión que expresa diferentes cadenas ligeras humanas. Los anticuerpos híbridos resultantes, que contienen una cadena ligera humana y una cadena pesada no humana, se seleccionan después para la unión del antígeno. Las cadenas ligeras que participan en la unión al antígeno luego se expresan conjuntamente con una biblioteca de cadenas pesadas de anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos resultantes se seleccionan una vez más para determinar la unión al antígeno. Técnicas como esta se describen con más detalle en la patente de Estados Unidos 5.565.332. Además, se puede usar un antígeno para inocular a un animal que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. 5.661.016.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoclonal que tiene especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes, puede prepararse usando los anticuerpos desvelados en el presente documento. Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymology* 121:210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basó en la coexpresión de dos pares de cadenas de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas que tienen diferentes especificidades (Millstein y Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539).

De acuerdo con un enfoque para hacer anticuerpos biespecíficos, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, regiones CH2 y CH3. Es preferente tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se transfectan simultáneamente en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son de significancia particular.

En un enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de la inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas. Este enfoque se describe en la publicación PCT No. WO 94/04690, publicada el 3 de marzo de 1994.

Los anticuerpos heteroconjugados, que comprende dos anticuerpos unidos covalentemente, también están dentro del alcance de la divulgación. Dichos anticuerpos se han utilizado para dirigir las células del sistema inmunitario a las células no deseadas (patente de Estados Unidos N.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (publicaciones PCT N.º WO 91/00360 y WO 92/200373; y documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes y técnicas de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980. También se pueden producir fragmentos Fv de cadena única, tal como se describe en Iliades *et al.* 1997, *FEBS Letters*, 409: 437-441. El acoplamiento de tales fragmentos de cadena única utilizando varios enlazadores se describe en Kortt *et al.*, 1997, *Protein Engineering*, 10: 423-433. Diversas técnicas para la producción recombinante

y la manipulación de anticuerpos son bien conocidas en la técnica.

Se contempla que la presente divulgación abarca no solo los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente, pero también cualquier fragmento de los mismos que contenga la región de unión activa de los anticuerpos, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, fragmentos Fv y similares. Dichos fragmentos pueden producirse a partir de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento utilizando técnicas bien establecidas en la materia (Rousseaux et al. (1986), in *Methods Enzymol*, 121:663-69 Academic Press).

Los métodos para preparar fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de 100 Kd denominado F (ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' de 50 Kd. Como alternativa, una escisión enzimática con papaína produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.036.945 y 4.331.647 y las referencias contenidas en las mismas. Asimismo, véase Nisonoff et al. (1960), *Arch Biochem. Biophys.* 89: 230; Porter (1959), *Biochem. J.* 73: 119, Edelman et al., en *METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1*, página 422 (Academic Press 1967).

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

La divulgación abarca modificaciones a anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento, incluyendo anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente a sus propiedades y variantes que tienen una actividad y/o afinidad mejoradas o disminuidas. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 5F1 o anticuerpo humanizado, puede mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada al CD43 o CEA expresados por la célula cancerosa. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no necesita describirse con detalle en el presente documento. Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de forma perjudicial la actividad funcional, o el uso de análogos químicos.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a una etiqueta de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Las variantes de sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de la región FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla a continuación bajo el encabezado "Sustituciones conservadoras". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominadas "sustituciones de ejemplo" en la tabla a continuación, o como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y explorarse los productos.

Sustituciones de aminoácidos

Resto original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones a modo de ejemplo
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln

(continuación)		
Resto original	Sustituciones conservadoras	Sustituciones a modo de ejemplo
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe;
-		Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

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

- (1) no polares: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polar sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Ácido (con carga negativa): Asp, Glu;
- (4) Básico (con carga positiva): Lys, Arg;
- (5) Restos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gli, Pro; y
- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

Las sustituciones no conservadoras se realizan al intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. Por el contrario, se pueden añadir enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv.

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

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales, tales como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos están glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65: 111-128; Wright y Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32). Las cadenas laterales de los oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd et al., 1996, *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, *Biochem.* 29:4175-4180) y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína, que puede afectar a la conformación y presentar la superficie tridimensional de la glicoproteína

(Hefferis y Lund, citado anteriormente; Wyss y Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7: 409-416). Los oligosacáridos pueden servir también para dirigir una glucoproteína dada a determinadas moléculas basándose en las estructuras de reconocimiento específicas. Se ha notificado también que la glicosilación de anticuerpos altera la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, células CHO con tetraciclina regularon la expresión de la  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), se notificó que una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisectora, se informó de que había mejorado la actividad ADCC (Umana et al., 1999, *Mature Biotech.* 17: 176-180).

La glicosilación de anticuerpos es normalmente una unión al átomo de N o una unión al átomo de O. La unión al átomo de N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, en las que X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza sistemáticamente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unida al átomo de N). La alteración puede realizarse también mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

El patrón de glicosilación de los anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran parte de la célula hospedadora utilizada para expresar el anticuerpo. Debido al tipo de célula utilizado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, ya que la terapéutica potencial rara vez es la célula nativa, pueden esperarse variaciones en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070).

Además de la selección de las células hospedadoras, los factores que afectan a la glicosilación durante la producción de anticuerpos recombinantes incluyen el modo de crecimiento, la formulación de medios, la densidad del cultivo, la oxigenación, pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuesto varios métodos para alterar el modelo de glicosilación conseguido en un organismo hospedador concreto incluyendo introducir o expresar en exceso determinadas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (patentes de Estados Unidos números 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o determinados tipos de glicosilación, puede ser eliminada de la glicoproteína, utilizando, por ejemplo, la endoglicosidasa H (Endo H), N-glicosidasa F, endoglicosidasa F1, endoglicosidasa F2, endoglicosidasa F3. Además, la célula huésped recombinante puede modificarse genéticamente para que sea defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas técnicas, y técnicas similares son bien conocidas en la materia.

Otros métodos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitación, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Se pueden utilizar modificaciones, por ejemplo, para la unión de marcadores para inmunoensayo. Los polipéptidos modificados se fabrican utilizando procedimientos establecidos en la técnica y se pueden rastrear usando ensayos estándar conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación y en los ejemplos.

El anticuerpo o polipéptido puede estar conjugado (por ejemplo, unido) a un agente, tal como un agente terapéutico y un marcador. Ejemplos de agentes terapéuticos son restos radiactivos, citotoxinas o moléculas quimioterapéuticas.

El anticuerpo (o polipéptido) puede estar unido a un marcador, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva, una enzima, o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "marcador" se refiere a cualquier molécula que se pueda detectar. En una determinada realización, un anticuerpo puede marcarse mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado. En una determinada realización, los restos de biotina que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos) pueden unirse al anticuerpo. En determinadas realizaciones, un marcador puede incorporarse o unirse a otro reactivo que a su vez se une al anticuerpo de interés. Por ejemplo, un marcador puede incorporarse o unirse a un anticuerpo que, a su vez, se une específicamente al anticuerpo de interés. En determinadas realizaciones, el marcador también puede ser terapéutico. En la técnica se conocen varios procedimientos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas y se pueden usar. Algunas clases generales de marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores enzimáticos, fluorescentes, quimioluminiscentes y radiactivos. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), marcadores fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, fósforos de lantánidos, ficoeritrina (PE)), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, penicilinas, luciferasa), quimioluminiscentes,

grupos biotínico, epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metal, marcas de epítomo). En determinadas realizaciones, los marcadores están unidos por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

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

15 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona composiciones (descritas en el presente documento) para su uso en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, ya sea en el contexto de uso como medicamento y/o uso para la fabricación de un medicamento.

#### 20 Polinucleótidos, vectores y células huésped

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

25 En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 1, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada que comprende una, dos o tres CDR de la SEQ ID NO: 1, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera que comprende una, dos o tres CDR de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 9, y/o una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:10.

35 En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 3, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada que comprende una, dos o tres CDR de la SEQ ID NO: 3, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera que comprende una, dos o tres CDR de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 11, y/o una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:12.

45 En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 5, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada que comprende una, dos o tres CDR de la SEQ ID NO: 5, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera que comprende una, dos o tres CDR de la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 13, y/o una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:14.

55 En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 7, y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 15, y/o una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:16.

60 Los expertos en la técnica apreciarán que, como consecuencia de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Por lo tanto, se contemplan específicamente los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso del codón. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento están dentro del alcance de la presente divulgación. Los alelos son genes endógenos que están alterados como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de

65

nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, pero no necesariamente, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse utilizando técnicas estándar (como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de bases de datos).

- 5 Los polinucleótidos de esta divulgación pueden obtenerse usando síntesis química, métodos recombinantes, o PCR. Los métodos de síntesis química de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica y no es necesario describirlos en detalle en el presente documento. Un experto en la técnica puede usar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.
- 10 Para preparar polinucleótidos utilizando métodos recombinantes, un polinucleótido que comprende una secuencia deseada puede insertarse en un vector adecuado, y el vector a su vez puede introducirse en una célula huésped adecuada para la replicación y amplificación, como se explica más adelante en el presente documento. Los polinucleótidos pueden insertarse en células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman mediante la introducción de un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, F-apareamiento o electroporación. Una vez introducidos, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la
- 15 célula como un vector no integrado (como un plásmido) o integrado en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido amplificado de este modo se puede aislar de la célula huésped mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989).
- 20 Como alternativa, la PCR permite la reproducción de las secuencias de ADN. La tecnología de PCR es bien conocida en la técnica y se describe en la patente de EE.UU. Números 4.683.195, 4.800.159.4.754.065 y 4.683.202, así como PCR: The Polymerase Chain Reaction”, Mullis et al. eds., Prensa de Birkawer, Boston (1994).

25 La divulgación también proporciona vectores (por ejemplo, vectores de clonación, vectores de expresión) que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de los polipéptidos (incluidos los anticuerpos) descritos en el presente documento. Los vectores de clonación adecuados pueden construirse según técnicas estándar o pueden seleccionarse de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Mientras que el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se pretende utilizar, los vectores de clonación útiles generalmente tienen la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer un único objetivo

30 para una endonucleasa de restricción particular y/o puede portar genes para un marcador que puede usarse para seleccionar clones que contienen el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK +) y sus derivados, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera, tales como pSA3 y pAT28. Estos y muchos otros vectores de clonación están disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene y Invitrogen.

35 Los vectores de expresión generalmente son construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la divulgación. El vector de expresión puede ser replicable en las células huésped, ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, entre otros, plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y

40 vectores de expresión desvelados en la publicación PCT n.º WO 87/04462. Los componentes del vector generalmente pueden incluir, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminadores). Para la expresión (es decir, traducción), uno o más elementos de control de la traducción también suelen ser necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de iniciación de la

45 traducción y codones de terminación.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de una serie de medios apropiados, incluida electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección

50 (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso, tal como el virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

La divulgación también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos o vectores descritos en el presente documento. Cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos puede usarse con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no

55 limitantes de células huésped de mamíferos incluyen, entre otros, células COS, HeLa y CHO. Véase también la publicación PCT N.º WO 87/04462. Las células huésped no mamífero adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*).

## 60 Usos diagnósticos

La presente divulgación proporciona un método para usar los anticuerpos, polipéptidos y polinucleótidos de la presente divulgación para detección, diagnóstico y seguimiento de una enfermedad, trastorno o afección asociado con la expresión del epítipo (ya sea mayor o menor en relación con una muestra normal y/o expresión inapropiada,

65 tal como la presencia de la expresión en tejidos o células que normalmente carecen de la expresión del epítipo).

En algunas realizaciones, el método comprende detectar la expresión del epítipo en una muestra obtenida de un sujeto sospechoso de tener cáncer, tal como cáncer colorrectal, pancreático, gástrico y pulmonar. Preferentemente, el método de detección comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo, polipéptido o polinucleótido y determinar si el nivel de unión difiere del de una muestra de control o comparación. El método también es útil para determinar si los anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento son un tratamiento adecuado para el paciente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "una muestra" o "una muestra biológica" se refiere a un organismo completo o un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes (por ejemplo, fluidos corporales, incluidos, entre otros, sangre, moco, líquido linfático, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, saliva, fluido amniótico, sangre del cordón amniótico, orina, fluido vaginal y semen). "Una muestra" o "una muestra biológica" se refiere además a un homogeneizado, lisado o extracto preparado a partir de un organismo completo o un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes, o una fracción o porción de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, plasma, suero, líquido espinal, fluido linfático, las secciones externas de la piel, los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores, órganos. Muy a menudo, la muestra ha sido extraída de un animal, pero la expresión "una muestra" o "una muestra biológica" también puede referirse a células o tejidos analizados *in vivo*, es decir, sin retirada del animal. Normalmente, "una muestra" o "una muestra biológica" contendrán células del animal, pero el término también puede referirse a material biológico no celular, tales como las fracciones no celulares de la sangre, saliva u orina, que se puede usar para medir los niveles de polinucleótidos o polipéptidos asociados con el cáncer. "Una muestra" o "una muestra biológica" se refiere además a un medio, tal como un caldo o gel nutriente en el que se ha propagado un organismo, que contiene componentes celulares, tales como proteínas o moléculas de ácido nucleico.

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

Se pueden usar diversos métodos conocidos en la técnica para detectar la unión específica de anticuerpo-antígeno. Los inmunoensayos de ejemplo que pueden llevarse a cabo de acuerdo con la invención incluyen inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), inmunoensayo de fluorescencia (FIA), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunoensayo de inhibición nefelométrica (NIA), Ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayo (RIA). Un grupo indicador o grupo marcador, se pueden unir a los anticuerpos del sujeto y se seleccionan para satisfacer las necesidades de varios usos del método que a menudo están dictados por la disponibilidad del equipo de ensayo y los procedimientos de inmunoensayo compatibles. Los marcadores adecuados incluyen, sin limitación, radionúclidos (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ , o  $^{32}\text{P}$ ), enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, luciferasa o  $\beta$ -glucosidasa), restos o proteínas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, GFP, o BFP), o restos luminiscentes (por ejemplo, nanopartículas Qdot<sup>TM</sup> suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA). Las técnicas generales que se usarán para realizar los diversos inmunoensayos mencionados anteriormente son conocidas por los expertos en la técnica.

Para fines de diagnóstico, el polipéptido que incluye anticuerpos puede marcarse con un resto detectable que incluye, entre otros, radioisótopos, marcadores fluorescentes y diversos marcadores de enzimas y sustratos conocidos en la técnica. Los métodos para conjugar marcadores con un anticuerpo son conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los polipéptidos que incluyen anticuerpos no necesitan estar marcados y su presencia puede detectarse utilizando un anticuerpo marcado que se une a los anticuerpos.

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

Los anticuerpos y polipéptidos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*, tal como pruebas de imagen *in vivo*. En general, el anticuerpo o el polipéptido está marcado con un radionúclido (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ , o  $^3\text{H}$ ), de modo que las células o el tejido de interés puedan localizarse mediante inmunogammagrafía.

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

## 60 Usos terapéuticos

Una característica llamativa y sorprendente de los anticuerpos de la presente divulgación se refiere a su capacidad para inducir eficazmente la muerte de células cancerosas no hematopoyéticas. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona usos terapéuticos de los anticuerpos y polipéptidos en el tratamiento del cáncer, tales como, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular y cáncer de tiroides. Cualquier cáncer puede tratarse, tales como el cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de

pulmón, cáncer de mama, tumor cerebral, melanoma maligno, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, linfomas, linfomas de linfocitos T, mieloma múltiple, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, carcinoma de endometrio, cáncer de ovarios, cáncer de esófago, cáncer de hígado, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, cáncer cutáneo, carcinoma del tracto urinario, cáncer de próstata, coriocarcinoma, cáncer faríngeo, 5  
cáncer de laringe, tecomatosis, androblastoma, hiperplasia del endometrio, endometriosis, embrioma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, hemangioma, hemangioma cavernoso, angioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, neurofibroma, oligodendroglioma, meduloblastoma, ganglioneuroblastoma, glioma, rabdomyosarcoma, hamartoblastoma, sarcoma osteogénico, leiomyosarcoma, sarcoma de tiroides y tumor de Wilms, siempre y cuando la célula cancerosa exprese el epítipo reconocido por los anticuerpos descritos en el presente documento. El 10  
método puede comprender además una etapa de detección de la unión entre un anticuerpo o un polipéptido descrito en el presente documento y un tumor o célula cancerosa en un individuo a tratar.

En general, una cantidad eficaz de una composición que comprende un anticuerpo o un polipéptido se administra a un sujeto que necesita tratamiento, inhibiendo así el crecimiento de la célula cancerosa y/o induciendo la muerte de la célula cancerosa. Preferentemente, la composición está formulada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. 15

En una realización, la composición está formulada para la administración mediante inyección intraperitoneal, intravenosa, subcutáneas e intramuscular, y otras formas de administración tal como vía oral, mucosal, mediante inhalación, sublingual, etc. 20

En otra realización, la presente descripción también contempla la administración de una composición que comprende los anticuerpos o polipéptidos conjugados con otras moléculas, tales como marcadores detectables o agentes terapéuticos o citotóxicos. Los agentes pueden incluir, pero no se limitan a los mismos, radioisótopos, toxinas, toxoides, agentes inflamatorios, enzimas, moléculas antisentido, péptidos, citocinas, o agentes 25  
quimioterapéuticos. Los métodos para conjugar los anticuerpos con tales moléculas son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, publicaciones PCT WO 92/08495; documento WO 91/14438; documento WO 89/12624; patente de los Estados Unidos n.º 5.314.995; y documento EP 396.387.

En una realización, la composición comprende un anticuerpo o polipéptido conjugado a un agente citotóxico. Los 30  
agentes citotóxicos pueden incluir cualquier agente que sea perjudicial para las células. Una clase preferida de agentes citotóxicos que pueden conjugarse con los anticuerpos o fragmentos puede incluir, pero no se limitan a los mismos, paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina y 35  
análogos u homólogos de los mismos.

La dosis requerida para el tratamiento depende de la elección de la vía de administración, de la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la enfermedad del sujeto, el tamaño del sujeto, el peso, el área superficial, la edad y el sexo; otros medicamentos que se administran y el juicio del médico encargado del tratamiento. Las dosis adecuadas 40  
están en el intervalo de 0,01-1000,0 mg/kg.

En general, se puede usar cualquiera de las siguientes dosis: se administra una dosis de al menos aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal; al menos 45  
aproximadamente 750 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 250 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, o menos. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, se continuará el tratamiento hasta que se produzca una supresión 50  
deseada de los síntomas de enfermedad. Un régimen de dosificación de ejemplo comprende administrar una dosis semanal de aproximadamente 6 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas, dependiendo del patrón de decaimiento farmacocinético que el profesional desea lograr. Consideraciones empíricas, tal como la semivida, en general contribuirá a la determinación de la dosis. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. 55

En algunos temas, se puede requerir más de una dosis. La frecuencia de administración se puede determinar y ajustar a lo largo del tratamiento. Por ejemplo, la frecuencia de administración se puede determinar o ajustar según el tipo y la etapa del cáncer a tratar, si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo y el criterio del médico encargado de la atención. 60  
Normalmente, el médico administrará un anticuerpo terapéutico (tal como 5F1 humanizado), hasta que se alcance una dosis adecuada para lograr el resultado deseado. En algunos casos, las formulaciones de liberación sostenida continua de anticuerpos pueden ser apropiadas. Se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para conseguir una liberación sostenida.

En una realización, las dosis para los anticuerpos o polipéptidos pueden determinarse empíricamente en sujetos a los que se les ha administrado una o más administraciones. A los sujetos se les administran dosis crecientes de los 65

anticuerpos o polipéptidos. Para evaluar la eficacia de los anticuerpos o polipéptidos, los marcadores de los síntomas de enfermedad, tal como CD43 o CEA, pueden monitorizarse. La eficacia *in vivo* también se puede medir evaluando la carga o el volumen del tumor, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TDP) y/o la determinación de las tasas de respuesta (RR).

5 La administración de un anticuerpo o polipéptido de acuerdo con el método de la presente divulgación puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, si la finalidad de la administración es terapéutica o profiláctica y otros factores conocidos por los profesionales expertos. La administración de un anticuerpo o un polipéptido puede ser esencialmente continua durante un período de tiempo  
10 preseleccionado o puede estar en una serie de dosis espaciadas.

Otras formulaciones incluyen formas de administración adecuadas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, vehículos tales como liposomas. Véase, por ejemplo, Mahato et al. (1997) *Pharm. Res.* 14: 853-859. Las preparaciones liposomales incluyen, pero sin limitación, citofectinas, Vesículas multilamelares y vesículas unilamelares.  
15

En otra realización, la composición puede comprender uno o más agentes anticancerosos, uno o más anticuerpos descritos en el presente documento, o con un anticuerpo o polipéptido que se une a un antígeno diferente. Tal composición puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco anticuerpos diferentes. Los anticuerpos y otros agentes anticancerosos pueden estar en la misma formulación (por ejemplo, en una mezcla, como a menudo se denota en la técnica), o en formulaciones separadas pero se administran de manera concurrente o secuencial, son particularmente útiles en el tratamiento de una gama más amplia de la población de individuos.  
20

Un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos (como el anticuerpo 5F1 o la forma humanizada) también se puede usar para la administración y expresión de cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos en una célula deseada. Es evidente que se puede usar un vector de expresión para dirigir la expresión del anticuerpo o polipéptido. El vector de expresión puede administrarse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, por vía intraventricular, por vía oral, enteral, parenteral, intranasal, dérmica, sublingual o por inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, pistola de partículas o administración cateterizada, y administración tópica. Un experto en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471.  
25  
30  
35

También se puede usar la administración dirigida de composiciones terapéuticas que comprenden un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos. Las técnicas de administración de ADN mediadas por receptores se describen en, por ejemplo, Findeis et al., *Trends Biotechnol.* (1993) 11:202; Chiou et al., *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer* (J. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263:621; Wu et al., *J. Biol. Chem.* (1994) 269:542; Zenke et al. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87:3655; Wu et al. (1991), *J. Biol. Chem.* 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. Los intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg, y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN también pueden usarse durante un protocolo de terapia génica.  
40  
45

Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden administrarse utilizando vehículos de administración de genes. El vehículo de administración de genes puede ser de origen viral o no viral (véase, en general, Jolly (1994), *Cancer Gene Therapy* 1:51; Kimura (1994), *Human Gene Therapy* 5:845; Connelly (1985), *Human Gene Therapy* 1:185; y Kaplitt (1994), *Nature Genetics* 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes se puede inducir usando promotores endógenos de mamíferos o heterólogos. La expresión de la secuencia de codificación puede ser constitutiva o regulada.  
50

Los vectores basados en virus para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada son bien conocidos en la técnica. Los vehículos de ejemplo basados en virus incluyen, pero sin limitación, retrovirus recombinantes, por ejemplo, publicaciones PCT n.º WO 90/07936; documento WO 94/03622; documento WO 93/25698; documento WO 93/25234; documento WO 93/11230; documento WO 93/10218; documento WO 91/02805; las patentes de Estados Unidos N.º 5.219.740; 4.777.127; la patente de GB n.º 2.200.651; y la patente EP n.º 0 345 242; vectores basados en alfavirus, por ejemplo, vectores de virus sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532), y de virus adenoasociados (AAV), por ejemplo, publicaciones PCT n.º WO 94/12649, documento WO 93/03769; documento WO 93/19191; documento WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655. La administración de ADN unido a adenovirus muertos como se describe en Curriel (1992), *Hum. Gene Ther.* 3: 147 también puede usarse.  
55  
60  
65

También se pueden emplear vehículos y métodos de administración no virales, incluyendo, pero sin limitación, ADN condensado policatiónico unido o no unido al adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curiel (1992), *Hum. Gene Ther.* 3:147); ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu (1989), *J. Biol. Chem.* 264:16985); células de vehículos de administración de células eucariotas (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 5.814.482; publicaciones PCT n.º WO 95/07994; documento WO 96/17072; documento WO 95/30763; y el documento WO 97/42338) y neutralización de la carga nucleica o fusión con membranas celulares.

También se puede emplear ADN desnudo. Los métodos de introducción de ADN desnudo a modo de ejemplo se describen en la publicación PCT n.º WO 90/11092 y en la patente de Estados Unidos n.º 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de liberación de genes se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 5.422.120; publicaciones PCT n.º WO 95/13796; documento WO 94/23697; documento WO 91/14445; y patente EP N.º 0 524 968. Otros enfoques se describen en Philip (1994), *Mol. Cell Biol.* 14:2411 y en Woffendin (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:1581.

La composición que comprende un anticuerpo se puede administrar de forma secuencial o concurrente con uno o más agentes terapéuticos diferentes, tales como agentes quimioterapéuticos (tales como 5-FU, 5-FU/MTX, 5-FU/leucovorina, Levamisol, Irinotecán, oxaliplatino, capecitabina o uracilo/tegafur), inmunoadyuvantes, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos y citocinas, etc. Las cantidades del anticuerpo y el agente terapéutico dependen de qué tipo de medicamentos se utilizan, la afección patológica que se está tratando, y la programación y las vías de administración, pero generalmente serían menores que si cada una se usara individualmente.

Tras la administración de la composición que comprende el anticuerpo descrito en el presente documento, la eficacia de la composición puede evaluarse tanto *in vitro* como *in vivo* mediante diversos métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Se conocen varios modelos animales para probar la actividad anticancerosa de una composición candidata. Estos incluyen xenoinjerto de tumores humanos en ratones atímicos desnudos o ratones scid/scid o modelos genéticos de tumores murinos como los ratones defectivos para p53. La naturaleza *in vivo* de estos modelos animales los hace particularmente predictivos de las respuestas en pacientes humanos. Dichos modelos pueden generarse introduciendo células en ratones singénicos usando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implantación del bazo, Implantación intraperitoneal e implantación debajo de la cápsula renal, etc.

#### Kits

La divulgación también proporciona kits para su uso en los presentes métodos. Los kits incluyen uno o más receptores que comprenden un anticuerpo purificado o un polipéptido descrito en el presente documento e instrucciones para su uso de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del anticuerpo para tratar un cáncer no hematopoyético, tal como cáncer colorrectal, de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. El kit puede comprender además una descripción de la selección de un individuo adecuado para el tratamiento basado en identificar si ese individuo tiene la enfermedad y la etapa de la enfermedad, o si el epítipo se expresa en las células cancerosas en el individuo.

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

Las instrucciones relacionadas con el uso de los anticuerpos o polipéptidos para tratar el cáncer generalmente incluyen información sobre la dosis, la posología y la vía de administración para el tratamiento previsto. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes de dosis múltiples) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits suelen ser instrucciones escritas en una etiqueta o en un prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero las instrucciones legibles por una máquina (por ejemplo, instrucciones en un disco de almacenamiento óptico u magnético) también son aceptables.

El marcador o el prospecto indican que la composición se utiliza para tratar un cáncer descrito en el presente documento. Se pueden proporcionar instrucciones para practicar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Los kits están en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, viales, botellas, frascos, envases flexibles (por ejemplo, Mylar sellado o bolsas de plástico), y similares. También se contemplan los envases para uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo descrito en el presente documento. El recipiente puede comprender además un segundo agente

farmacéuticamente activo.

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre el recipiente o asociado con el mismo.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención.

#### **Ejemplo 1: Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CD43 expresado en células cancerosas**

##### Generación de anticuerpos monoclonales

La línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano, COLO 205 (ATCC CCL-222) se adquirió del Instituto de Investigación y Desarrollo de la Industria de Alimentos (CCRC 60054), Hsinchu, Taiwán, y se cultivó en medio RPMI 1640 (GIBCO BRL) con 10 % de FBS (Hyclone), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (GIBCO BRL) a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. Un ratón hembra de 8 semanas Balb/c se inmunizó tres veces con 2x10<sup>7</sup> células COLO 205 en 500 µl de PBS o 10 microgramos de proteína purificada parcial en CFA cada dos semanas y finalmente se administró un pulso de 2x10<sup>6</sup> células COLO 205 o 10 microgramos de proteína purificada parcial en 200 µl de PBS. Cinco días después del pulso final, las células del bazo se fusionaron con células de mieloma X63. Los hibridomas se seleccionaron con DMEM suplementado con FBS al 10 % (Hyclone) y HAT (Hybri-Max®, Sigma H0262, a una concentración final de 100 µM de hipoxantina, aminopterin 0,4 µM, timidina 16 µM). Se han generado tres líneas celulares de hibridoma m5F1, m51-41, m138-10, que secretan el anticuerpo monoclonal 5F1, 51-41 y 138-10.

##### Identificación y caracterización del antígeno diana para el anticuerpo monoclonal 5F1

Se aislaron proteínas de membrana de tejidos de cáncer colorrectal o células COLO 205 con tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1 % de Nonidet P-40) que contiene inhibidores de proteasa (comprimidos completos; Roche Molecular Biochemicals). Los lisados de proteína de membrana se aclararon previamente primero en una columna de 1 ml que contenía IgG de ratón no inmune inmovilizada en Proteína G Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech Inc., N.J., EE.UU.), y la porción de flujo se aplicó directamente a una columna de 1 ml de 5F1 acoplada a la proteína G-Sepharose. La columna se lavó y la proteína diana de 5F1 se eluyó. La pureza de la proteína aislada se visualizó mediante tinción con plata y también se identificó mediante transferencia Western después de la separación en SDS-PAGE al 8 %. La proteína aislada también se usó para inmunizar ratones para generar otros anticuerpos similares a 5F1 tales como 138-10 o 51-41.

Para LOS experimentos de inmunoprecipitación, las proteínas de la membrana se incubaron con 5F1 o un anticuerpo anti-CD43 (AF2038, R&D System, Inc.) seguido de incubación con proteína G Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech Inc., N.J., Estados Unidos). Los precipitados se realizaron en SDS-PAGE al 8 % y se sometieron a análisis de transferencia (o inmuno) Western.

Las proteínas se mezclaron con un volumen igual de tampón de muestra (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, DTT 100 mM, 2 % de SDS, azul de bromofenol al 0,1 %, glicerol al 10 %), separados por 8 % de SDS-PAGE y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Super, Amersham). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche desnatada al 5 % en PBS y se incubó con mAb 5F1 o anti-CD43 (AF2038). Luego se trató la transferencia con inmunoglobulina anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa) y se desarrolló con reactivos de quimioluminiscencia (ECL, Amersham, RU).

Para probar si 5F1 reconoce CD43, un mAb anti-CD43 disponible comercialmente (AF2038, R&D system, Inc.) se usó para confirmar la identidad de la proteína purificada por afinidad 5F1 de los lisados COLO 205 mediante análisis de transferencia Western. Los lisados de una línea celular negativa de unión a 5F1 COLO 320 se usaron como control. Los resultados de los inventores (Fig. 1) mostraron que los anticuerpos anti-CD43 (AF2038) y 5F1 reaccionaron con la proteína capturada por la columna de inmunoafinidad 5F1, sugiriendo fuertemente que 5F1 sí reconoce CD43.

##### El anticuerpo monoclonal 5F1 reconoce específicamente CD43 expresado en la superficie celular de células cancerosas no hematopoyéticas.

Se sembraron 2x10<sup>5</sup> células COLO 205 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en v y se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpo 5F1, que van desde 0,33 a 1 µg/ml, a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con 200 µl de tampón FACS (1x PBS + 1 % FBS), se tiñeron con 100 µl de 1 µg/ml (en tampón FACS) IgG-PE anti-ratón de cabra (Southern Biotech.), y luego se incuban a 4 °C durante 30 min. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS y se analizaron mediante citometría de flujo (BD LSR, BD Life

Sciences).

Los resultados de unión a anticuerpos de la citometría de flujo se muestran en la Tabla 1 a continuación. El anticuerpo monoclonal como 5F1 (isotipo: IgG3), o 138-10 (isotipo IgM), o 51-41 (isotipo IgM) reconoce una superficie CD43 expresada en las membranas citoplásmicas de las células de cáncer colorrectal COLO 205 y las células de cáncer gástrico NCI-N87, pero no linfocitos T periféricos ni células Jurkat (una línea celular de leucemia linfoblastoide; ATCC TIB-152). Véase la tabla 1, más adelante. Los datos de citometría de flujo (Fig. 2A y Fig. 2B) también muestran que 5F1 se une a otros tipos de células cancerosas, tales como las células de cáncer colorrectal (DLD-1) y las células de cáncer gástrico (NCI-N87), pero no las células endoteliales normales (HUVEC), células pulmonares normales (MRC-5), células epiteliales de la glándula mamaria normal (MCF-10A), células colorrectales normales (CCD841-CoN), linfocitos T activados (activados durante siete días) o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) normales.

La Tabla 1 muestra las propiedades de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CD43 como 5F1, 138-10 o 51-41 para el cáncer colorrectal, células cancerosas gástricas, linfocitos T periféricos humanos y células Jurkat (una línea celular de leucemia linfoblastoide).

% de Unión/Ab	Linfocitos T periféricos	Jurkat (células de leucemia)	COLO 205	NCI-N87 (células de cáncer gástrico)
5F1	<10 %	<10 %	> 80 %	> 80 %
138-10	< 10 %	< 10 %	> 80 %	> 80 %
51-41	<10 %	< 10 %	> 80 %	> 80 %
Anti-CD 162	> 80 %	> 80 %	< 10 %	No analizado
MEM-59 (anti CD43; Biovendor, Candler, NC)	> 80 %	No analizado	> 70 %	No analizado
Ab de control de isotipo	< 10 %	< 10 %	< 10 %	< 10 %

Para detectar la expresión de la proteína diana de 5F1 en células COLO 205 y tejidos de cáncer colorrectal humano, se utilizó un método inmunohistoquímico de rutina. Brevemente, las células o los tejidos se fijaron para inmunotinción con 1 µg/ml de 5F1, se incubaron con IgG anti-ratón marcada con biotina, luego se incubaron con el complejo de peroxidasa avidina-biotina (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, EE.UU.) y se tiñeron con el cromógeno tetracloruro de 3,3'-diaminobenzidina. Un estudio inmunohistoquímico mostró que el 52,5 por ciento de los tejidos de los pacientes con cáncer colorrectal (31/59) se tiñeron de forma positiva con 5F1.

### **Ejemplo 2. Actividad apoptótica de anticuerpos que se unen específicamente a CD43 expresado en células cancerosas**

#### Detección de la apoptosis inducida por 5F1 en células COLO 205 mediante ensayo ELISA

Para evaluar el tipo de muerte celular inducida por 5F1, las células de cáncer colorrectal se cultivaron en placas de cultivo y se incubaron con o sin 5F1. El nivel de fragmentación de ADN internucleosómico (apoptótico) se determinó mediante la captura mediada por anticuerpos y la detección de complejos de histonas y ADN citoplásmicos asociados a mononucleosomas y oligonucleosomas mediante el kit Cell Cell Detection ELISAPLUS (Roche, n.º de cat. 1774425). El ensayo ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron  $1 \times 10^4$  células COLO 205 en cada pocillo de placas de 96 pocillos y se incubaron con 5F1 o 9E10 (un anticuerpo anti-myc) a una concentración de 10 µg/ml, o con control de medio. Después de 6, 24 o 48 horas de incubación a 37 °C, las células se lavaron y se incubaron con 200 µl de tampón de lisis durante 30 minutos. Después de sedimentar los núcleos (200 x g, 10 min), se transfirieron 20 µl del sobrenadante (fracción citoplásmica) que contenía el ADN fragmentado a placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina que se habían incubado con anticuerpo antihistona monoclonal biotinilado. La cantidad de ADN fragmentado de los nucleosomas unidos al anticuerpo anti-histona se evaluó mediante un anticuerpo anti-ADN monoclonal conjugado con peroxidasa utilizando ABTS (sal de 2,2-azino-di[3-etilbenzotiazolina-sulfonato-6-diamonio]) como sustrato. Por último, la absorbancia a 405 nm, al incubarse con un sustrato de peroxidasa durante 10-20 minutos, se determinó con un lector de microplacas (Molecular Devices, SPECTRA max M2). Los valores de los pocillos que contenían tampón de lisis y sustrato solo se restaron como fondo. Los datos se analizaron como el enriquecimiento específico de mono- y oligonucleosomas liberados en el citoplasma a partir de los valores utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de enriquecimiento (E.F.)} = \frac{\text{mU de la muestra (células moribundas/muertas)}}{\text{mU del control de medio (células sin tratamiento con mAb)}}$$

mU = absorbancia [10<sup>-3</sup>]

5 Los datos que se muestran en la Figura 3 indican que 5F1 indujo un enriquecimiento de los nucleosomas en el citoplasma de las células COLO 205 después de 24 horas de incubación. El ADN fragmentado detectado en el citoplasma tratado con 5F1 se incrementó más de 4 veces en comparación con el control del medio. Tal enriquecimiento no se observó en los linfocitos tratadas con el anticuerpo de control 9E10 (un anticuerpo anti-myc) o medio solo, lo que indica que 5F1 solo causó que las células cancerosas se sometieran a apoptosis.

10 Detección de la apoptosis inducida por 5F1.138-10. y 51-41 en células COLO 205 que utilizan tinción con anexina V y PI

15 La anexina V tiñe los fosfolípidos que fluyen hacia el lado externo de la membrana citoplásmica en la etapa temprana del proceso de apoptosis. Por lo tanto, la tinción de anexina V, según lo analizado por análisis FACS, indica las células sometidas a apoptosis. Se sembraron 1,2 x 10<sup>5</sup> células COLO 205 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, y luego se añadieron a las células diversas concentraciones de 5F1 (2-16 µg/ml) diluidas en el medio o medio fresco (control sin tratar). Para probar si el reticulador (CL) es necesario para 5F1 para inducir la apoptosis en células tumorales, Se añadieron 20 µg/ml de IgG anti-ratón de conejo (Jackson ImmunoResearch, n.º cat. 315-005-045) en un conjunto de muestras para comparación. Después de una incubación de 6 horas a 37 °C, las células se tiñeron con 0,25 µl de anexina V conjugada con FITC (Strong Biotech Corporation) en 100 µl de tampón de unión a anexina V a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, las células se tiñeron con yoduro de propidio (PI, un pigmento de tinción e ADN) y se analizaron mediante citometría de flujo.

25 Los datos de citometría de flujo mostraron que el tratamiento de 5F1, en ausencia del reticulador, durante 6 horas a una concentración de 4 µg/ml o más, un número significativo de células de cáncer colorrectal se sometieron a apoptosis, lo que sugiere que 5F1 solo podría inducir efectivamente la apoptosis en células COLO 205.

30 El efecto de la inducción de la apoptosis de las células COLO 205 por otros anticuerpos anti-C43, 138-10 y 51-41, también se probó. La tabla 2 a continuación muestra la apoptosis inducida por 5F1, 138-10 o 51-41 en células de cáncer colorrectal. Las células COLO 205 se incubaron con 32 microgramos/ml de cada anticuerpo durante 6 horas y se tiñeron con anexina-V y luego con PI, seguido de análisis FACS.

Tabla 2. Inducción de la apoptosis en células COLO 205 por 5F1, 138-10 y 51-41.

	5F1	138-10	51-41	Ab DE control (control negativo)
% De apoptosis (anexina-V <sup>+</sup> )	> 40 %	> 30 %	>30 %	< 15 %

35 Los resultados anteriores muestran que los tratamientos con anticuerpos específicos para el cáncer expresados en CD43 pueden inducir la apoptosis en una célula cancerosa.

40 Detección de la apoptosis inducida por m5F1 en células NCI-87 mediante tinción con YO-PRO-1 o tinción con anexina V y PI

45 Se sembraron 4x10<sup>5</sup> células de NCI-N87 (línea celular de carcinoma gástrico humano) o 5x10<sup>5</sup> células de COLO 205 en una placa de cultivo de 12 pocillos (Nunc N.º de catálogo 150628). Después de la cultura de la noche a la mañana, el medio se cambió y los anticuerpos a las concentraciones indicadas en la Figura 10 o azida se añadieron durante 6 horas de incubación. A continuación, las células se digirieron con tripsina y se recolectaron para tinción con YO-PRO-I (Invitrogen, número de catálogo Y3603) o tinción doble con anexina-V-FITC y PI (Strong Biotech, kits de detección de apoptosis, n.º de catálogo AVK250).

50 Tal como se muestra en las Figuras 10A y 10B, el anticuerpo m5F1 indujo apoptosis en células NCI-87 y COLO 205 según se midió mediante tinción con YO-PRO-1 (A) y tinción doble con anexina-V-FITC y PI (B). Estos datos indican que m5F1 también puede inducir apoptosis en células de carcinoma gástrico.

### Ejemplo 3. Inhibición del crecimiento de células cancerosas por 5F1

55 5F1 solo inhibe el crecimiento de las células cancerosas

60 Se sembraron células de cáncer colorrectal (COLO 205) y células endoteliales normales (HUVEC) y se incubaron con 5F1 o un anticuerpo de control 9E10. También se incluyeron células no tratadas como controles negativos. La supervivencia celular se evaluó utilizando ensayos de MTT y WST-1 para detectar la actividad proliferativa como se describe en este documento.

El ensayo de WST-1 se basa en la escisión de la sal de tetrazolio WST-1 en formazán por deshidrogenasas mitocondriales celulares. El formazán producido se puede cuantificar por espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 450 nm. La proliferación de células viables da como resultado un aumento en la actividad general de las enzimas; y la disminución de la actividad enzimática indica inhibición del crecimiento celular. Por lo tanto, el ensayo WST-1 se utilizó para evaluar la tasa de supervivencia de las células tumorales después del tratamiento con 5F1. Brevemente, se sembraron  $4 \times 10^3$  células COLO 205 en 100  $\mu$ l de medio de cultivo en 5 duplicados para cada tratamiento en una placa de cultivo de 96 pocillos. Luego 10  $\mu$ g/ml de 5F1, se añadió el anticuerpo de control 9E10 (un anticuerpo anti-myc) o un medio fresco (control sin tratar). El tratamiento de azida sódica al 0,5 % ( $\text{NaN}_3$ ) también se incluyó en el ensayo como control de citotoxicidad. Después de un período de incubación de tres días a 37 °C, se añadieron 20  $\mu$ l de reactivo WST-1 (Roche, N.º de cat.1664807) a cada pocillo y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Se obtuvo una absorbancia a 450 nm para reflejar la tasa de supervivencia de las células tratadas. Los resultados del ensayo WST-1 para células COLO 205 se muestran en la Figura 4. Los datos indicaron que el crecimiento de las células COLO 205 se inhibió sustancialmente (Fig. 4) mientras que el tratamiento con 5F1 no influyó en el de HUVEC (datos no mostrados). El porcentaje de la tasa de supervivencia se redujo a menos del 50 % en el anticuerpo 5F1 tratado en comparación con las células de cáncer colorrectal tratadas con el anticuerpo de control de isotipo 9E10. El grupo de control positivo tratado con azida sódica al 0,5 % mostró una tasa de supervivencia del 19 %.

En otro experimento, se sembraron células ( $2 \times 10^3$ ) en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron con 10 microgramos/ml de anticuerpo monoclonal 5F1 o anticuerpo de control 9E10 (un anticuerpo contra c-myc). Las células no tratadas se usaron como controles negativos; y las células tratadas con azida sódica al 0,5 % se usaron como controles positivos. Después de un período de incubación de dos o tres días a 37 °C, se añadieron 10  $\mu$ l de reactivo WST-1 a cada pocillo y las células se incubaron adicionalmente durante 30 minutos. El ensayo de supervivencia celular WST-1 se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Los resultados, mostrados en la figura 5, indicaron que el crecimiento de las células de carcinoma colorrectal, tal como COLO 205, fue inhibido sustancialmente por el anticuerpo 5F1, pero la línea celular colorrectal normal (tal como CCD841-CoN no se efectuó.

El MTT es otro método basado en tetrazolio para la medición de la viabilidad y proliferación celular. El MTT amarillo de tetrazolio (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazolio) se reduce por células metabólicamente activas, en parte por la acción de las enzimas deshidrogenasas, para generar equivalentes reductores, tales como NADH y NADPH. El formazán púrpura intracelular resultante se puede solubilizar y cuantificar por medios espectrofotométricos. Se sembraron células ( $5 \times 10^3$ ) en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron con anticuerpo monoclonal 5F1 (intervalo de concentración de 0-64  $\mu$ g/ml) o un anticuerpo de control 9E10 (64  $\mu$ g/ml) contra c-myc. Las células no tratadas se usaron como controles negativos; y las células tratadas con azida sódica al 0,5 % se usaron como controles positivos. Después de 72 horas de incubación a 37 °C, se añadieron 10  $\mu$ l de reactivo MTT a cada pocillo y las células se incubaron más durante 2-4 horas hasta que se ve un precipitado púrpura. Se añaden 100  $\mu$ l de reactivo detergente (DMSO). Se registra la absorbancia de las muestras a 570 nm. Los datos del ensayo MTT demostraron que 5F1 inhibía la proliferación celular de COLO 205 de una manera dependiente de la dosis (de 0 a 64  $\mu$ g/ml) y la  $\text{DE}_{50}$  (dosis eficaz para una inhibición del 50 %) fue de 8  $\mu$ g/ml (Fig. 6). Como también se indica en la Fig. 6, se encontró una notable inhibición del crecimiento celular cuando se utilizaron 64  $\mu$ g/ml de 5F1 mientras que el anticuerpo de control 9E10 no tuvo tal efecto a la misma concentración.

#### Evaluación de los efectos antitumorales de 5F1 *in vivo*

Los efectos antitumorales *in vivo* de 5F1 se analizaron en un modelo de ratón con xenoinjerto de tumor. Se implantaron  $5 \times 10^6$  células COLO 205 por vía subcutánea en la región del flanco posterior de ratones SCID el día 0. Una semana después de la inoculación de las células, en un experimento, los ratones se trataron con 500 microgramos de 5F1 o PBS mediante inyección intraperitoneal. En otro experimento, cuatro grupos de ratones (6 ratones en cada grupo) con tumores establecidos se trataron por vía intravenosa cada dos días con cuatro dosis de 25 mg/kg de 5-fluorouracilo más leucovorina (5 FU/IV) y con o sin varias dosis de 5F1 por inyección intraperitoneal dos veces a la semana.

En un experimento, el implante tumoral en ratones SCID se logró mediante inyección subcutánea de células de cáncer colorrectal COLO 205 a  $1 \times 10^7$  células por ratón en el día 0 y luego se trató mediante inyección intraperitoneal de anticuerpo monoclonal 5F1 (a 500  $\mu$ g por dosis) o control anticuerpo monoclonal 9E10 (y anticuerpo generado contra c-myc) o PBS en los días 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 17. Se utilizaron quince ratones en cada grupo del experimento. El tamaño del tumor se midió desde el día 5 hasta el día 24 por el producto del ancho, ancho, y longitud ( $W \times W \times L$ ) y se expresaron por  $\text{mm}^3$ . Como se muestra en la Figura 7, el anticuerpo monoclonal 5F1 suprimió de manera efectiva el crecimiento del tumor en comparación con el anticuerpo de control 9E10 y PBS (sin tratar).

Para ver los efectos combinados de 5F1 y fármacos químicos como 5FU/IV, a los ratones se les inyectó iv con 25 mg/kg de 5FU/IV en días alternos durante 4 dosis y se inyectó ip con o sin varias cantidades de anticuerpos 5F1 dos veces a la semana durante 3 semanas después de 7 días del implante del tumor. El crecimiento del tumor se evaluó basándose en la medición dos veces a la semana del volumen del tumor ( $\text{mm}^3$ ) mediante calibradores y el tamaño del tumor se calculó mediante la fórmula:  $\pi/6 \times \text{diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2$  (Kievit E, Cancer Research, 60:

6649-55). Tal como se muestra en la Fig. 8, la combinación de tratamientos con el anticuerpo 5F1 y 5FU/IV inhibió significativamente el crecimiento del tumor colorrectal humano en comparación con los de los fármacos químicos tratados solo (Figura 8).

**5 Ejemplo 4. Tres nuevos anticuerpos anti-CD43. 5F1, 138-10, y 51-41, reconocen epítipo similar expresado en células cancerosas.**

Para comprender la propiedad de unión de tres nuevos anticuerpos anti-CD43 (5F1, 138-10 y 51-41), Se utilizó el análisis FACS. Las células COLO 205 (100.000) se tiñeron con 1 microgramo/ml de 5F1 biotinilado a 4 grados C durante 1 hora en presencia de diversas cantidades de anticuerpo 5F1, 138-10 y 51-41 no biotinilados. Después de los lavados, las células se tiñeron adicionalmente con estreptavidina-FITC en las mismas condiciones durante 30 minutos. Las células se lavaron y analizaron mediante FACS. Los datos que se muestran en la Tabla 3 a continuación son la intensidad de fluorescencia media de un experimento representativo. Los anticuerpos 51-41 y 138-10 pudieron competir por la unión de 5F1 biotinilado a células COLO 205, lo que sugiere que los tres anticuerpos se unen en el sitio de unión similar expresado en la superficie de las células COLO 205.

Tabla 3. 5F1, 138-10 y 51-41 reconocen epítopos similares expresados en células COLO 205.

Concentración de anticuerpos competitivos (microgramos/ml)	Fluorescencia media Intensidad en presencia de 5F1, 51-41 o 138-10 sin marcar		
	5F1	51-41	138-10
200	9,78	75,66	199,7
66,7	60,28	165,62	297,03
22,2	21,67	325,23	395,53
7,4	129,04	606,20	640,42
2,46	733,36	783,81	702,79
0,82	1004	789,23	724,15
0,273	1027	901,36	683,08
0,09	825	869,61	717,19
0,03	888	860,13	704,33

**20 Ejemplo 5. Determinación del epítipo del anticuerpo 5F1**

Para definir mejor la estructura del epítipo reconocida por el anticuerpo monoclonal 5F1, este anticuerpo monoclonal se usó para probar su reactividad específica a diferentes secuencias polipeptídicas. Las placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con el anticuerpo 5F1 con 50 µl por pocillo a la concentración de 10 µg/ml en tampón de recubrimiento de NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,6) 0,1 M durante la noche a 4 °C. Después de lavar, las placas se bloquearon mediante incubación con un tampón de bloqueo que contenía NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M (pH 8,6), 5 mg/ml de ASB, NaN<sub>3</sub> al 0,02 % (150 µl/pocillo) durante al menos una hora a 4 °C. Las placas se incubaron luego con proteínas de fusión que contenían varios fragmentos de polipéptidos en las diversas concentraciones durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar con Tween al 0,5 % que contiene TBS, los polipéptidos de la proteína de fusión unida se eluyeron con 1 mg/ml de BSA que contenía 0,2 M de tampón de glicina-HCl (pH 2,2) y se neutralizaron con Tris-HCl 1 M (pH 9,1). Luego se determinó la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión-polipéptidos eluida. Los polipéptidos a los que se une el anticuerpo 5F1 contienen una secuencia tripeptídica de Trp-Pro-Ile (WPI), desde el extremo N al extremo C. Esta secuencia de aminoácidos tripeptídica no está presente en la secuencia de aminoácidos de CD43. Pallant et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1328-32, 1989; Shelley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2819-23, 1989.

Para confirmar aún más el epítipo tripéptido al que se une el anticuerpo 5F1, se realizó ELISA de tipo sándwich. Las placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con anticuerpo (5F1 o anticuerpo de control 9E10) con 50 µl por pocillo a la concentración de 1 µg/ml durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon mediante incubación con 0,25 % de BSA en PBS (150 µl/pocillo) durante 1 hora a 37 °C. Las placas se incubaron después con proteínas de fusión que contenían diversos fragmentos de polipéptidos fusionados con una proteína transportadora durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar 4 veces con PBS que contiene 0,05 % de Tween 20, las placas se incubaron después con un anticuerpo específico de la proteína portadora a 2 µg/ml durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron 4 veces con PBST. luego se añadieron a cada pocillo 50 µl de 1 a 3000 anticuerpos específicos de la proteína anti-portadora de cabra diluida conjugada con HRP y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. La reacción de la enzima se llevó a cabo mediante la adición de un sustrato de la enzima HRP para determinar la reactividad del polipéptido designado a estos dos anticuerpos (5F1 y 9E10). La

5 tabla 4 a continuación muestra los datos del ensayo ELISA cuando se inmovilizaron 5F1 o 9E10 en la placa. "+" indica que el polipéptido designado se une al anticuerpo monoclonal; e indica que el polipéptido designado no se une al anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal 5F1 reconoció una estructura de epítipo de WPI tripéptido. Dado que la secuencia de WPI tripéptido no está presente en CD43, estos datos sugieren que 5F1 reconoce un epítipo conformacional que incluye una estructura que tiene características físicas y/o químicas similares o equivalentes a la estructura formada por el tripéptido WPI.

Tabla 4. Estructuras de epítipos reconocidas por 5F1,

Nombre del péptido	Secuencias de aminoácidos	5F1	9E10
5F1-01-2-21	<b>W P I D L M S E T P I L</b> (SEQ ID NO:17)	+	-
5F1-01-2-04	<b>W P I A N H E N A L S A</b> (SEQ ID NO:18)	+	-
5F1-01-2-18	<b>W P I S G K H S F W S L</b> (SEQ ID NO:19)	+	-
5F1-01-2-17	<b>W P I L D H A V S R P S</b> (SEQ ID NO:20)	+	-
5F1-01-2-16	<b>W P I D I P Y A W D F S</b> (SEQ ID NO:21)	+	-
5F1-01-2-13	<b>W P I S P Q P G A R P V</b> (SEQ ID NO:22)	+	-
5F1-01-2-09	<b>W P I A P N R Y L L S S</b> (SEQ ID NO:23)	+	-
5F1-01-2-06	<b>W P I P P E V E P F K H</b> (SEQ ID NO:24)	+	-
5F1-01-2-05	<b>W P I L Q N A A G T G L</b> (SEQ ID NO:25)	+	-
5F1-01-2-23	<b>W P I P T L M E L P S A</b> (SEQ ID NO:26)	+	-
5F1-01-2-22	<b>W P I T N S D S R I T W</b> (SEQ ID NO:27)	+	-
5F1-01-2-14	<b>W P I H S A H V R Y T T</b> (SEQ ID NO:28)	+	-
9F9-01-03-24	<b>A E T D Y D P D H F T P</b> (SEQ ID NO:29)	-	-
9F9-01-03-18	<b>D A R Y S H D P A W P Y</b> (SEQ ID NO:30)	-	-
9F9-01-03-17	<b>A G Q K W D P E W P H S</b> (SEQ ID NO:31)	-	-
9F9-01-03-21	<b>Y D H H W T N P P T Q K</b> (SEQ ID NO:32)	-	-
9F9-01-03-25	<b>E P N M D P N W A S P S</b> (SEQ ID NO:33)	-	-

10 **Ejemplo 6. Clonación de las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas de 5F1, 138-10 y 51-41, y humanización de anticuerpos**

15 Los ADNc de región variable de las cadenas ligeras y pesadas de 5F1 se amplificaron mediante PCR y los ADNc sintetizados se subclonaron en pCRII (Invitrogen) para la determinación de la secuencia. Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron de varios clones independientes y se analizaron. La secuencia de ADNc idéntica de los clones independientes se eligió para representar la región V de la cadena ligera o pesada de cada anticuerpo. La Tabla 5 a continuación muestra las secuencias de aminoácidos traducidas y las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones V de las cadenas ligera y pesada de 5F1, 138-10, 51-41 y 5F1 humanizado (h5F1Vc).

20 Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos y secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de los anticuerpos (las CDR están subrayadas)

**Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada 5f1 (SEQ ID NO:1) y secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:9)**

```

1  M E W S W I F L F L L S G T A G V H S E
1  ATGGAATGGAGTTGGATATTTCTCTTTCTCCTGT CAGGAAGCTG CAGGTGCCACTCTGAG

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

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

61  G Q G L D W I G Y I N P Y N G G T Q Y N
    
```

25

181 GGGCAGGGCCTTGACTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGGTGGTACTCAGTACAAT  
 81 E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y M  
 241 GAGAAGTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG  
 101 E L S S L T S E D S A V Y Y C A R R T F  
 301 GAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGACCTTC  
 121 P Y Y F D Y W G Q G T T L T V S S  
 361 CCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de 5F1 (SEQ ID NO:2) y secuencia de nucleótidos (SEQ ID 10)

1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D  
 1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTGGTGTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGAT  
 21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I  
 61 GTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC  
 41 S C R S S Q S I L H S N G N T Y L E W Y  
 121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAATGGTAC  
 61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S  
 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTTTCT  
 81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S  
 241 GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC  
 101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H A P L  
 301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTACTACTGCTTTCAAGGTTCACTGCTCCTCTC  
 121 T F G A G T K L E L K  
 361 ACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

5

138-10 secuencia de aminoácidos de cadena pesada (SEQ ID NO:3) y secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:11)

1 M E C N W I L P F I L S V I S G V Y S E  
 1 ATGGAATGTAAGTGGATACTTCCTTTTATCTGTGCGTAATTTCAAGGGTCTACTCAGAG  
 21 V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S  
 61 GTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTCCGTGAAGATGTCC  
 41 C K A S G Y S F I S Y W M H W V K Q R P  
 121 TGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTATCAGCTACTGGATGCACTGGGTAACAGAGGCCT  
 61 G Q G L E W I G A I S P G D S D T T Y N  
 181 GGACAGGGTCTAGAATGGATTGGTCTATTTCTCCTGGAGATAGTGATACTACCTACAAC  
 81 Q R F T G K A K L T A V T S A S T A Y M

10

241 CAGAGGTTACGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATG  
 101 E L S S L T N E D S A V Y Y C I R R D G  
 301 GAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTATAAGAAGGGATGGT  
 121 N Y Q V A W F A Y W G Q G T L V T V S A  
 361 AACTACCAAGTTGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

138-10) secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (SEQ ID NO:4) y secuencia de nucleótidos (SEQ ID 12)

1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D  
 1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTCTGATGTTCTGGATTCTGCTCCAGCAGTGAT  
 21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I  
 '61 GTTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCATC  
 41 S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W Y  
 121 TCTTGCAATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTAC  
 61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S  
 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT  
 81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S  
 241 GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGC  
 101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P F  
 301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCATTC  
 121 T F G S G T K L E I K  
 361 ACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA

5

51-41 secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO: 5) y secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 13)

1 M E C N W I L P F I L S V I S G V Y S E  
 1 ATGGAATGTAAGTGGATACTTCTTTTATTCTGTCGGTAATTCAGGGGTCTACTCAGAG  
 21 V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S  
 61 GTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCCGTAAGATGTCC  
 41 C K A S G Y S F T S Y W M H W V K Q R T  
 121 TGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAAACAGAGGACT  
 61 G Q G L E W I G A I S P G D G D T T Y N  
 181 GGGCAGGGTCTAGAATGGATTGGTGTCTATTCTCCTGGAGATGGTGATACTACCTACAAC  
 81 Q K F T G K A K L T A V T S A S T A Y M  
 241 CAGAAGTTCACGGGCAAGGCCAAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATG  
 101 E L S S L T H E D S A V Y Y C T R R D G  
 301 GAGCTCAGCAGCCTGACACATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAAGAGATGGT  
 121 S Y Q V A W F A Y W G R G T L V T V S A  
 361 AGCTACCAAGTTGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCGAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

10

51-41 secuencia de aminoácidos de cadena ligera (SEQ ID NO:6) y secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:14)

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

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

41 S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W F  
 121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTCCATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTTC

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

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

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

121 T F G S G T K L E I K  
 361 ACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAATAAAA

5 h5F1Vc secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO:7) y secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:15)

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

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

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

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

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

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

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

**secuencia de aminoácidos de cadena ligera de h5F1Vc (SEC ID NO: 8) y secuencia de nucleótidos (SEC ID NO:16)**

```

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

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

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

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

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

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

121  L T F G Q G T K V E L K
361  CTCACGTTCCGGTCAGGGGACCAAGGTGGAGCTGAAA
    
```

5

**Ejemplo 7. Producción y caracterización del anticuerpo quimérico 5F1**

Construcción y Producción de Anticuerpo Quimérico 5F1 (c5F1)

10 Para construir vectores para la expresión de anticuerpos quiméricos, la región V de la cadena ligera de 5F1 se subclonó en el plásmido pVk. pVk contiene un promotor de CMV y la región constante de la cadena ligera humana. La secuencia y la información biológica sobre la región constante de la cadena ligera humana se pueden encontrar en Hieter, P.A., et al. (1980), *Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments*. Cell, 22(1 Pt 1): pág. 197-207.

15 La región V de la cadena pesada de 5F1 se subclonó en el plásmido pVk. El plásmido pVg1 tiene un promotor de CMV y la región constante de la cadena ligera humana de IgG1. La secuencia y la información biológica sobre la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana se pueden encontrar en Ellison, J.W., B.J. Berson, y L.E. Hood (1981), *The Nucleotide sequence of a human immunoglobulin C gamma 1 gene.*, Nucleic Acids Res. 10:4071.

20 Los plásmidos que expresan la cadena ligera y pesada se cotransfectaron luego en células Cos-7. Los sobrenadantes que contenían c5F1 se recogieron y analizaron para determinar la función inductora de apoptosis de c5F1.

25 Pruebas funcionales de c5F1

El sobrenadante que contiene c5F1 se probó luego para determinar su unión a las células COLO 205 mediante tinción de la superficie y su función mediante el ensayo de apoptosis con anexina V como se ha descrito anteriormente. Para el ensayo de unión, se utilizaron 0,58 microgramos/ml de c5F1. Para el ensayo de apoptosis, se usaron 2 ~ 32 microgramos/ml de m5F1, c5F1 y 9E10 (anticuerpo de control anti-myc) y la incubación fue durante 16 horas. El sobrenadante que contenía c5F1 se une a las células COLO 205 e induce la apoptosis en las células COLO 205, al igual que su homólogo de ratón, demostrando que los fragmentos de ADNc clonados codifican en realidad las regiones V de 5F1 (Fig. 9A y Fig. 9B).

35 **Ejemplo 8. Estudio de inmunohistoquímica tisular del cáncer colorrectal con m5F1 Tinción tisular con m5F1**

La expresión de la diana m5F1 se investigó mediante inmunohistoquímica en muestras de tejido tumoral primario incrustadas en parafina de pacientes con cáncer colorrectal (n = 59). Las matrices de tejidos de los tejidos de cáncer de colon y recto humanos incorporados en parafina se obtuvieron de los laboratorios SuperBioChips (matriz de tejidos humanos, N.º de cat. CD1). Se utilizaron procedimientos de tinción estándar para la inmunohistoquímica de acuerdo con las instrucciones del fabricante (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories). Todas las secciones se calentaron a 58 °C durante 1 hora, se desparafinaron con xileno cinco veces y se rehidrataron en una serie de etanol con una concentración decreciente. Después de bloquear con suero normal (VECTASTAIN, PK6102) durante

40

1 hora, las secciones se incubaron con el m5F1 a una concentración de 1 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado (VECTASTAIN, PK6102). Las secciones se incubaron luego con un complejo de estreptavidina-biotina (VECTASTAIN, PK6102). Los portaobjetos se desarrollaron con una solución de diaminobencidina. Finalmente, los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron, se limpiaron y se montaron en glicerol al 50 % en PBS.

Evaluación de la calificación

La expresión de antígenos en cada sección de tejido fue evaluada por dos observadores independientes y la tinción con 5F1 se clasificó utilizando un sistema empírico semicuantitativo: -, negativa; + -, tinción débil; +, tinción moderada; ++, tinción fuerte.

Resultados

En todas las secciones, la tinción con m5F1 fue predominantemente membranosa. En total, 31 de las 59 muestras de tumores (52,5 %) mostraron una tinción positiva para el objetivo 5F1, entre ellos, 27 (45,8 %) mostraron fuertes niveles de expresión. 19 muestras (32,2 %) mostraron tinción negativa para la expresión de diana m5F1. Un resumen de los resultados de tinción en todas las muestras de cáncer colorrectal analizadas se muestra en la Tabla 6 a continuación. Estos datos indican que el anticuerpo m5F1 se puede usar para diagnosticar el cáncer colorrectal.

Tabla 6. Frecuencia de expresión del 5F1 diana en cánceres colorrectales humanos

Muestra de cáncer colorrectal/resultado de tinción de m5F1									
1 ++	2 ++	3 ++	4 -	5 ++	6 +-	7 ++	8 -	9 ++	10 ++
11 ++	12 -	13 ++	14 +-	15 -	16 -	17 ++	18 ++	19 +-	20 ++
21 +	22 +-	23 +	24 -	25 ++	26 -	27 -	28 -	29 ++	30 ++
31 +-	32 -	33 -	34 ++	35 ++	36 -	37 -	38++	39 ++	40 ++
41 +	42 ++	43 -	44 -	45 -	46 -	47 +-	48 ++	49 -	50 +
51 ++	52 ++	53 +-	54 ++	55 ++	56 ++	57 +-	58 +-	59 -	60carbon
++: 27/59 (45,76 %) +: 4/59 (6,78 %) + -: 9/59 (15,25 %) 19/59 (32,20 %)									

**Ejemplo 9. m5F1 se une a CEA humano recombinante (rhCEA) y CD43 (rhCD43) expresado por COLO 205, pero no reconoce rhCEA o rhCD43 expresado por células COS-7**

Preparación de la muestra de proteínas

Inmuno-precipitación para CEA recombinante etiquetado con bandera en células COLO 205 y COS: El ADNc que codifica la proteína CEA de longitud completa (35 ~ 702aa) se clonó en el plásmido pFlag-CMV-1. El ADN plasmídico diseñado se introdujo en COLO 205 (para la ingeniería de líneas celulares estables) mediante electroporación o células COS (para el experimento de expresión transitoria) mediante lipofectamina 2000 (Invitrogen, número de catálogo 11668-019). Las células que expresaban el antígeno se recogieron y se lisaron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 150 mM, 1 % de NP40) que contiene inhibidores de la proteasa (Roche, número de catálogo 11836145001). El sobrenadante de los lisados celulares se incubó con anti-marcador (M2, Stratagene, n.º de catálogo 200472) perlas de sefarosa acopladas a proteína G (GE Healthcare, n.º de catálogo 17-0618-02) durante 2 horas a 4 °C. Las perlas de proteína G Sepharose se lavaron tres veces con tampón de lisis. Las perlas de proteína G Sepharose que contenían productos IP se usaron para SDS-PAGE y transferencia de tipo Western.

Purificación de proteína recombinante soluble para CD43 marcada con Cr1 expresada en células COLO 205: El ADNc que codifica el dominio extracelular de la proteína CD43 se clonó en el plásmido pcDNA3 modificado que contiene el marcador N-terminal y los marcadores Cr1 C-terminal. El ADN plasmídico diseñado se introdujo en las células COLO 205 mediante electroporación para el desarrollo de líneas celulares estables. El hCD43<sup>20-253</sup> recombinante soluble expresado por COLO 205 contiene el marcador 3xFlag N-terminal y el marcador Cr1 C-terminal. La proteína soluble se purificó con perlas de proteína A Sepharose (GE Healthcare, n.º de catálogo 17-1279-02). Después se eluyó con tampón de glicina y se dializó contra PBS, las muestras de proteínas se almacenaron a -20 °C para uso futuro.

Lisado de células enteras para CD43 expresado de forma transitoria en células COS: Una construcción que contenía CD43 humana de longitud completa (en pcDNA3.1myc-His) se introdujo en las células COS mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen, número de catálogo 11668-019). Las células se lisaron con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 0,25 % de SDS, 1% de NP-40) que contiene inhibidores de la proteasa, y se centrifugaron a 21.900 g a 4 °C durante 10 minutos para recoger el sobrenadante. Después de la cuantificación de

Bio-Rad, se cargó una cantidad suficiente de lisados de proteínas en SDS-PAGE para el análisis de transferencia Western.

#### Análisis de transferencia Western

5 Después de añadir el tampón de muestra, las muestras de proteína se llevaron a ebullición a 95 °C, se cargaron en un mini-gel SDS-PAGE y luego se transfirieron a papel NC (GE Healthcare, Hybond-ECL, n.º de catálogo RPN303D). Después de bloquear las membranas con 5 % de leche desgrasada en TBS, se añadieron los 1º anticuerpos. La unión de los primeros anticuerpos se detectó con el segundo anticuerpo conjugado con HRP (NEN Life Science, anti-ratón IgG de cabra HRP, n.º de catálogo NEF822, o Southern Biotech, Ig anti-ratón de cabra-HRP, n.º de catálogo 1010-05) y se desarrolló con reactivos de detección de transferencia Western ECL (GE Healthcare, Número de catálogo RPN2106).

#### Resultados

15 En el experimento mostrado en la Fig. 11A, los lisados celulares de las células COLO 205 que expresaban rhCEA se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-marcados y las proteínas inmunoprecipitadas se corrieron en SDS-PAGE y se transfirieron a papel NC. El papel NC se transfirió con varios anticuerpos: anti-marcador, m5F1, 50-14, 51-41, 138-10, 186-14, 280-6, o anticuerpo anti-CEA (CEA/Ab-3; nombre del clon COL-1 de NeoMarker Cat. MS-613-P1ABX). Los datos en la Fig. 11A mostraron que m5F1, 51-41 y 138-10 reconocieron rhCEA expresado por células COLO 205. En el experimento mostrado en la Fig. 11B, los lisados celulares de las células COS-7 expresadas con rhCEA se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-marcador y las proteínas inmunoprecipitadas se pasaron en SDS-PAGE y se transfirieron a papel NC. El papel NC se transfirió con varios anticuerpos: anti-marcador, m5F1 o anti-CEA (CEA/Ab-3). Los datos en la Figura 11B mostraron que m5F1 no se unía a rhCEA expresado por células COS-7.

20 En el experimento mostrado en la Fig. 12A, Las proteínas solubles expresadas por COLO 205 se purificaron con perlas de proteína A Sepharose, se ejecutaron en gel de SDS y se transfirieron a papel NC. El papel NC se transfirió con varios anticuerpos: m5F1, 51-41, o 138-10. Los datos en la Fig. 12A mostraron que m5F1, 51-41 y 138-10 reconocieron rhCD43 expresado por células COLO 205.

25 En el experimento que se muestra en la Fig. 12B, las proteínas solubles expresadas en COLO 205 se purificaron con proteína A sefarosa y se pasaron en SDS-PAGE y se transfirieron a papel NC. El papel NC se secó con anti-CD43 (MEM59) (panel izquierdo) o m5F1 (panel derecho). Los datos en la Fig. 12B mostraron que m5F1 no reconocía rhCD43 expresado por células COS-7. Estos datos indican que el epítipo reconocido por m5F1 incluye una modificación postraduccional específica para ciertos tipos de células.

#### **Ejemplo 10. El epítipo reconocido por m5F1, 51-41 y 138-10 incluye una estructura de Lewis<sup>a</sup> (Le<sup>a</sup>) y es dependiente de fucosa**

##### Tratamiento con glucosidasa

30 El CEA humano recombinante (rhCEA) se produjo por la expresión de la proteína CEA humana en células COLO 205. El ADNc que codifica el rhCEA (CEA-N-A2), que es una fusión que tiene los aminoácidos 35-145 (dominio N) y los aminoácidos 324-415 (dominio A2) del CEA, se clonó en el plásmido pcDNA3 modificado que contiene el marcador Flag. La posición del residuo de aminoácido del CEA se basa en la posición del aminoácido en la pre-proteína. El ADN plasmídico diseñado se introdujo en células COLO 205 para la ingeniería de líneas celulares estables mediante electroporación. La proteína CEA recombinante se purificó a partir del sobrenadante de cultivo celular del CEA recombinante que expresaba líneas celulares estables usando un anticuerpo anti-marcador.

35 Para cada reacción, se incubaron aproximadamente 1,8 µg de proteína recombinante (rhCEA) con una cantidad diferente (0, 0,01, 0,03 o 0,1 mU) de solución de α-1 → (2,3,4) -fucosidasa de *Xanthomonas* sp. (Sigma, n.º de catálogo F1924) a 37 °C durante 20 horas. Tras el tratamiento, las muestras de proteína se cargaron en SDS-PAGE para la tinción con azul de Coomassie (panel izquierdo de la Fig. 13, panel izquierdo) o detección de transferencia de tipo Western (Fig. 13, panel derecho) con m5F1.

40 Tal como se muestra en la Fig. 13, la unión de m5F1 al rhCEA disminuyó cuando el antígeno se trató con α-1 → (2,3,4) -fucosidasa, lo que indica que m5F1 reconoce un glico-epítipo sensible a fucosa.

##### Ensayo de competición de oligosacáridos

45 Para probar más a fondo el glico-epítipo reconocido por m5F1, Se realizaron ensayos de competición con diversos oligosacáridos. Se compraron oligosacáridos (Lewis<sup>a</sup> de Sigma n.º de catálogo 03499, Lewis<sup>b</sup>-lactosa de Sigma n.º de catálogo L7033, Lewis<sup>x</sup>-lactosa de Sigma n.º de catálogo L7777, Lewis<sup>y</sup> de Sigma n.º de catálogo L7784, Sialil-Lewis<sup>x</sup> de Sigma n.º de catálogo S1782, Lacto-N-tetraosa de Sigma n.º de catálogo L6770, Lacto-N-difucohexaosa II de Sigma n.º de catálogo L6645, Lewis<sup>a</sup> de Calbiochem n.º de catálogo 434626, y β-lactosa de Sigma n.º de

catálogo L3750) y se disolvió en PBS. Las estructuras de estos oligosacáridos se muestran en la Fig. 14. Se añadieron oligosacáridos (a una concentración final 1 mM) en diferentes pocillos que contenían  $2 \times 10^5$  células COLO 205, seguido de la adición de los anticuerpos indicados (m5F1, 51-41 o 138-10; cada uno a 0,25 ug/ml). Después de una hora de incubación a 4 C, el sobrenadante se descartó y los anticuerpos secundarios (Southern Biotech, RPE anti-ratón IgG de cabra, n.º de catálogo 1032-09, o Southern Biotech, IgM anti-ratón de cabra RPE, n.º de catálogo 1022-09) se añadieron. Y las señales de unión celular se detectaron con análisis de citometría de flujo.

Tal como se muestra en la Fig. 15, LNDFH II, Le (a) -lactosa, y Le (a) todos inhibieron, a varios niveles, la unión de los anticuerpos m5F1, 51-41 y 138-10 a células COLO 205; y LNT también inhibió la unión de los anticuerpos 51-41 y 138-10, pero no inhibió significativamente la unión de m5F1 a células COLO 205. Esto indica que el epítipo reconocido por estos anticuerpos puede incluir una estructura de Lea o similar, y es sensible a la fucosa. Además, el anticuerpo m5F1 tiene una mayor dependencia de la fucosa que el anticuerpo 51-41 y 138-10.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, no debe interpretarse que las descripciones y ejemplos limitan el ámbito de la invención.

## Referencias

- Laos, S., Baeckstrom, D y Hansson, G.C. (2006) Inhibition of NF-kappaB activation and chemokine expression by the leukocyte glycoprotein, CD43, in colon cancer cells. *Int. J. Oncol.* 28(3):695-704.
- Fuhlbrigge, R.C., King, S.L., Sackstein, R. y Kupper, TS. (2006) CD43 is a ligand for E-selectin on CLA+ human T cells. *Blood.* 15; 107(4):1421-6.
- Matsumoto, M., Atarashi, K., Umemoto, E., Furukawa, Y., Shigeta, A., Miyasaka, M. y Hirata, T. (2005) CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells. *J. Immunol.* 15; 175(12):8042-50.
- Pimenidou, A., Madden, L. A., Topping, K.P., Smith, K.A., Monson, J.R. y Greenman, J. (2004) Novel CD43 specific phage antibodies react with early stage colorectal tumours. *Oncol. Rep.* 11(2):327-31.
- Kadaja, L., Laos, S. y Maimets, T. (2004) Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppressor proteins p53 and ARF. *Oncogene.* 19; 23(37):2523-2530.
- Fernandez-Rodriguez, J., Andersson, C.X., Laos, S., Baeckstrom, D., Sikut, A., Sikut, R. y Hansson, G.C. (2002) The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumour Biol.* 23(4):193-201.
- Cermak, L., Simova, S., Pintzas, A., Horejsi, V. y Andera, L. (2002) Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules. *J Biol Chem.* 8; 277(10):7955-61.
- Carlow, D.A., Corbel, S.Y. y Ziltener, H.J. (2001) Absence of CD43 fails to alter T cell development and responsiveness. *J Immunol.* 166(1):256-61.
- Nieto, M., Rodriguez-Fernandez, J.L., Navarro, F., Sancho, D., Frade, J.M., Mellado, M., Martinez-A, C., Cabanas, C. y Sanchez-Madrid, F. (1999) Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation. *Blood.* 94(8):2767-77.
- Sikut, R., Andersson, C.X., Sikut, A., Fernandez-Rodriguez, J., Karlsson, N.G. y Hansson, G.C. (1999) Detection of CD43 (leukosialin) in colon adenoma and adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain. *Int. J. Cancer.* 82(1):52-8.
- Lopez, S., Seveau, S., Lesavre, P., Robinson, M.K. y Halbwachs-Mecarelli, L. (1998) CD43 (sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells. *Cell Adhes. Commun.* 5(2): 151-60.
- Stockton, B. M., Cheng, G., Manjunath, N., Ardman, B., y von Andrian, U.H. (1998) Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity.* 8(3):373-81.
- McEvoy, L.M., Jutila, M.A., Tsao, P.S., Cooke, J.P. y Butcher, E.G. (1997) Anti-CD43 inhibits monocyte-endothelial adhesion in inflammation and atherogenesis. *Blood.* 90(9):3587-94.
- Baeckstrom, D. (1997) Post-translational fate of a mucin-like leukocyte sialoglycoprotein (CD43) aberrantly expressed in a colon carcinoma cell line. *J Biol Chem.* 272(17): 11503-9.
- McEvoy, L.M., Sun, H., Frelinger, J.G. y Butcher, E.G. (1997) Anti-CD43 inhibition of T cell homing. *J Exp Med.* 185(8):1493-8.
- Brown, T.J., Shuford, W.W., Wang, W.C., Nadler, S.G., Bailey, T.S., Marquardt, H. y Mittler, R.S. (1996) Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells. *J Biol Chem.* 271(44):27686-95.
- Santamaria, M., Lopez-Beltran, A., Toro, M., Pena, J. y Molina, I.J. (1996) Specific monoclonal antibodies against leukocyte-restricted cell surface molecule CD43 react with nonhematopoietic tumor cells. *Cancer Res.* 56(15):3526-9.
- Bazil, V., Brandt, J., Chen, S., Roeding, M., Luens, K., Tsukamoto, A. y Hoffman, R. (1996) A monoclonal antibody recognizing CD43 (leukosialin) initiates apoptosis of human hematopoietic progenitor cells but not stem cells. *Blood.* 87(4):1272-81.
- Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M. y Ardman, B. (1995) Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature.* 377(6549):535-8
- Nong, Y.H., Remold-O'Donnell, E., LeBien, T.W. y Remold, H.G. (1989) A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human

monocytes. *J Exp Med.* 170(1):259-67.

Mentzer, S.J., Remold-O'Donnell, E., Crimmins, M.A., Bierer, B.E., Rosen, F.S. y Burakoff, S.J. (1987) Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *J Exp Med.* 165(5): 1383-92.

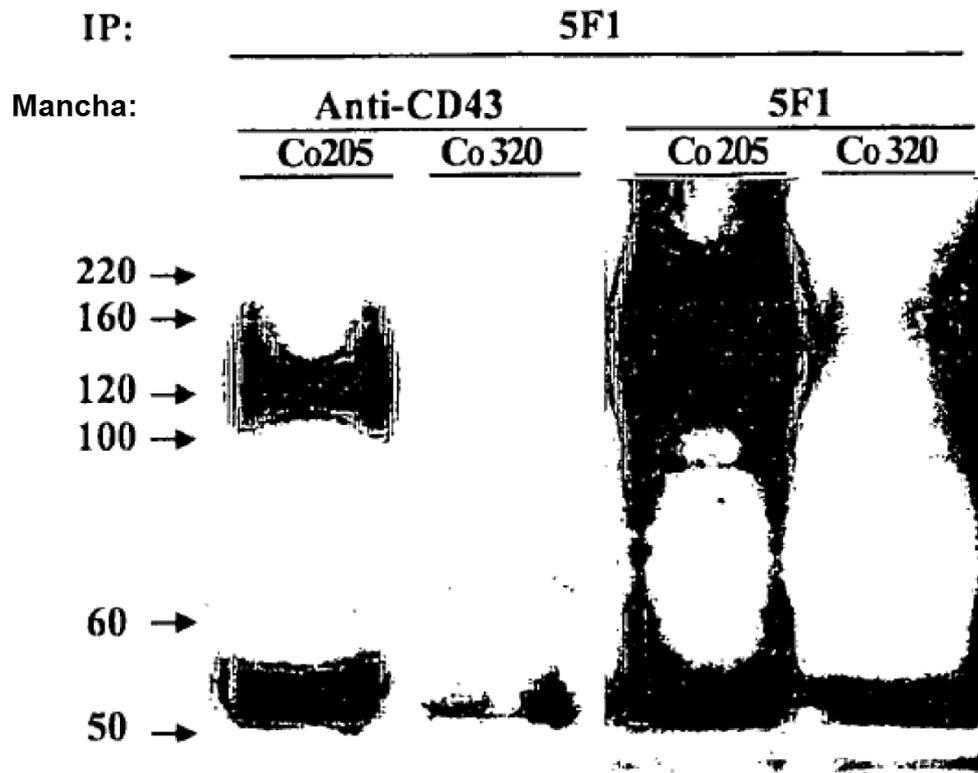
5 Pallant, A., Eskenazi, A., Mattei, MG., Fournier, R.E.K., Carlsson, S.R., Fukuda, M. y Frelinger, J. G. (1989) Characterization of cDNA encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1328-32.

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

## REIVINDICACIONES

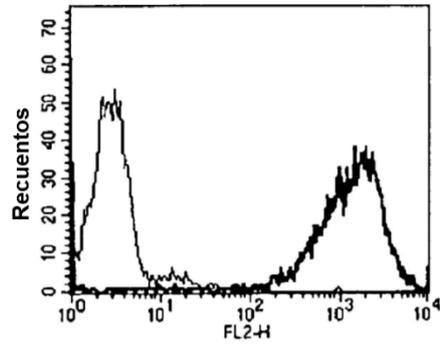
1. Un anticuerpo monoclonal aislado, anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de carbohidrato en CD43 o CEA expresado en la superficie de células cancerosas no hematopoyéticas, pero no se une específicamente a un CD43 expresado por linfocitos T periféricos o células Jurkat, y es capaz de inducir la apoptosis de la célula cancerosa no hematopoyética después de unirse *in vitro* al epítipo en la superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética en ausencia de conjugación con citotoxina y función efectora inmune, en donde la unión del anticuerpo al epítipo es inhibida por los oligosacáridos Le<sup>a</sup>, Le<sup>a</sup>-lactosa y lacto-N-difucohexaosa II (LNDFH II), en donde
- 5 a) el anticuerpo
- 10 (i) compite con un anticuerpo que comprende la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o
- 15 (ii) compite con un anticuerpo que comprende la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, y la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4; o
- 20 (iii) compite con un anticuerpo que comprende la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, para unirse al epítipo presente en la superficie celular de la célula cancerosa no hematopoyética; o en donde
- 25 b) el anticuerpo comprende
- 30 (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde HCDR1 comprende SYVMH, HCDR2 comprende YINPYNGGTQYNEKFKG y HCDR3 comprende RTFPYYFDY, y una región variable de la cadena ligera que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2, en donde LCDR1 comprende RSSQSILHSNGNTYLE, LCDR2 comprende KVSNRFS y LCDR3 comprende FQGSHAPLT, o
- 35 (ii) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:2 o
- 40 (iii) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 7, y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:8; o
- 45 (iv) una región variable de la cadena pesada que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, donde que HCDR1 comprende SYWMH, HCDR2 comprende AISP GDSDTTYNQRF TG y HCDR3 comprende RDGNYQVAVFAY, y una región variable de la cadena ligera que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, en donde LCDR1 comprende RSSQSIVHSNGNTYLE, LCDR2 comprende KVSNRFS y LCDR3 comprende FQGSHVPFT, o
- 50 (v) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; o
- 55 (vi) una región variable de la cadena pesada que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, en donde HCDR1 comprende SYWMH, HCDR2 comprende AISP GDSDTTYNQKFTG y HCDR3 comprende RDGSYQVAVFAY y una región variable de la cadena ligera que comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:6, en donde LCDR1 comprende RSSQSIVHSNGNTYLE, LCDR2 comprende KVSNRFS y LCDR3 comprende FQGSHVPFT o
- 60 (vii) la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5, y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:6.
2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
3. El anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
5. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la célula cancerosa no hematopoyética es una célula cancerosa colorrectal o gástrica.
6. Una célula que produce el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 5 9. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 9.
- 10 11. Un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método para tratar el cáncer no hematopoyético en un individuo que tiene cáncer, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de dicho anticuerpo monoclonal, en donde el anticuerpo se une a las células cancerosas en el individuo.
- 15 12. El anticuerpo monoclonal para su uso de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo monoclonal está conjugado con una citotoxina.
- 20 13. El anticuerpo monoclonal para el uso de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo es para su uso en combinación con una cantidad de otro agente anticanceroso, por lo que el anticuerpo monoclonal y el agente contra el cáncer en conjunto proporcionan un tratamiento eficaz del cáncer en el individuo.
- 25 14. El anticuerpo monoclonal para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el cáncer no hematopoyético es cáncer colorrectal o gástrico.
- 30 15. El anticuerpo monoclonal para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el agente anticanceroso es un agente quimioterapéutico.
- 35 16. Uso de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer no hematopoyético, en un individuo que tiene cáncer, con un método que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de dicho anticuerpo monoclonal en donde el anticuerpo se une a las células cancerosas en el individuo.
- 40 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el anticuerpo monoclonal se conjuga con una citotoxina; o en el que el anticuerpo es para su uso en combinación con una cantidad de otro agente anticanceroso, por lo que el anticuerpo monoclonal y el agente contra el cáncer en conjunto proporcionan un tratamiento eficaz del cáncer en el individuo.
- 45 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en el que el cáncer no hematopoyético es cáncer colorrectal o gástrico.
19. Uso de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que el agente anticanceroso es un agente quimioterapéutico.
20. Un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; e instrucciones para administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica a un individuo para tratar el cáncer no hematopoyético.

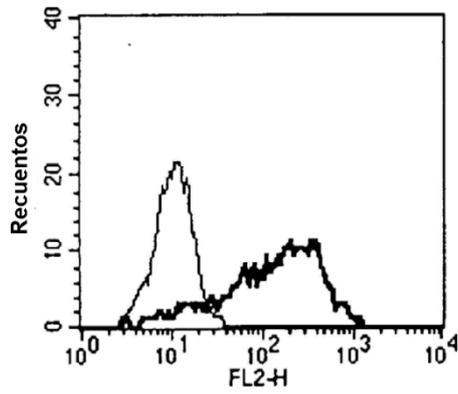


**Figura 1**

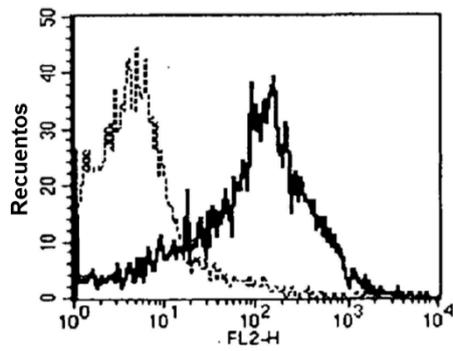
### COLO 205



### DLD-1



### NCI-N87



**Figura 2A**

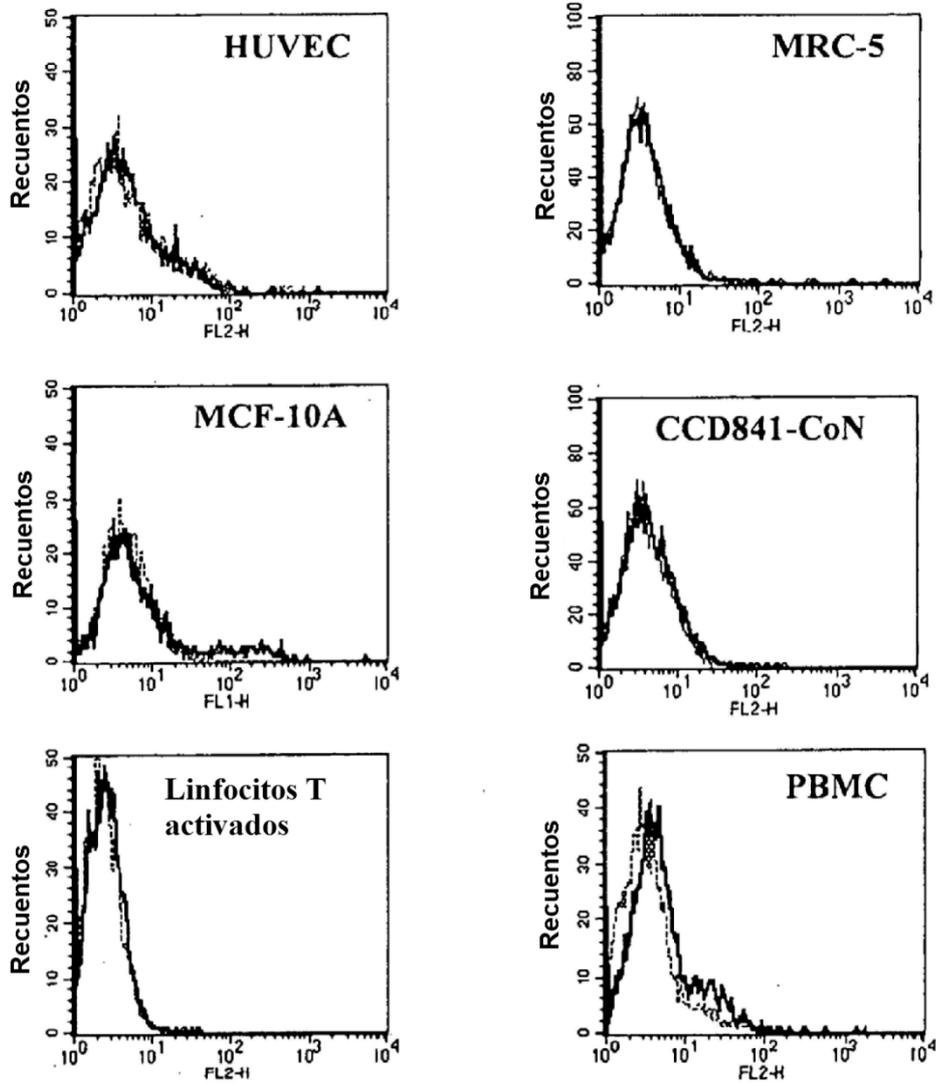


Figura 2B

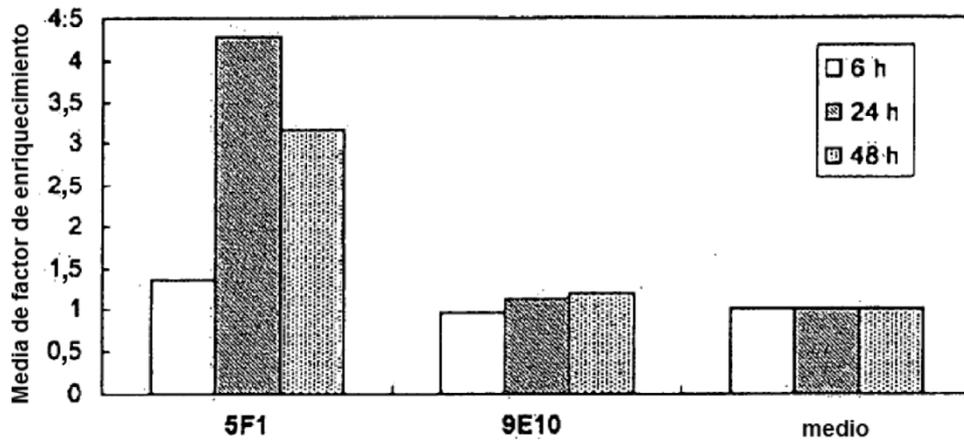


Figura 3

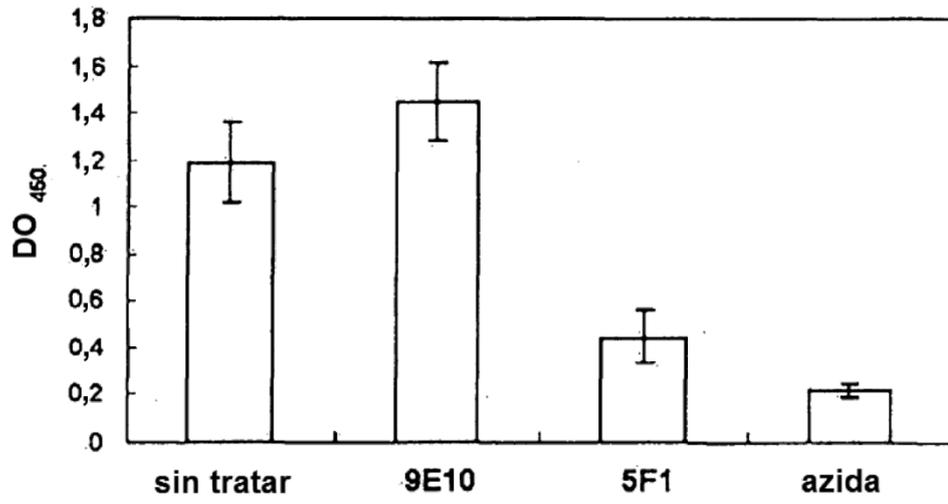
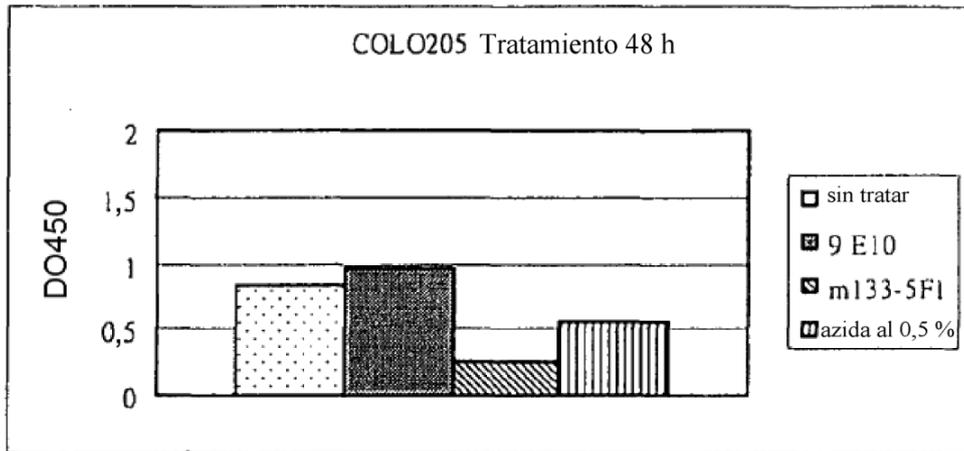


Figura 4

Líneas celulares de cáncer colorrectal



Línea celular colorrectal normal

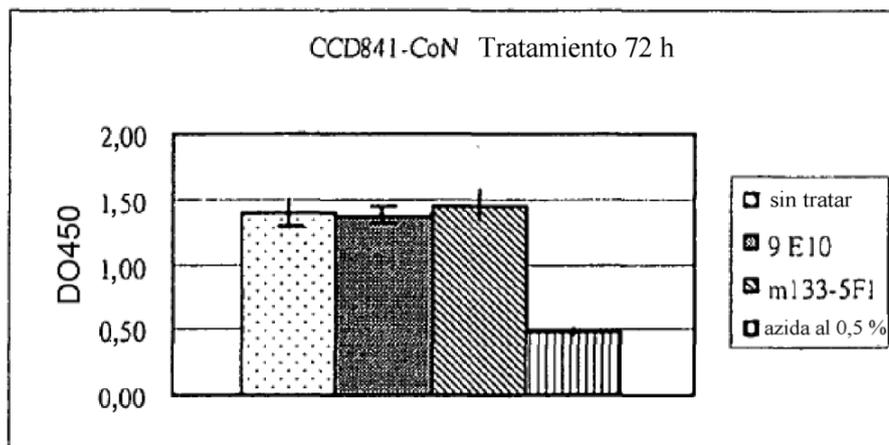


Figura 5

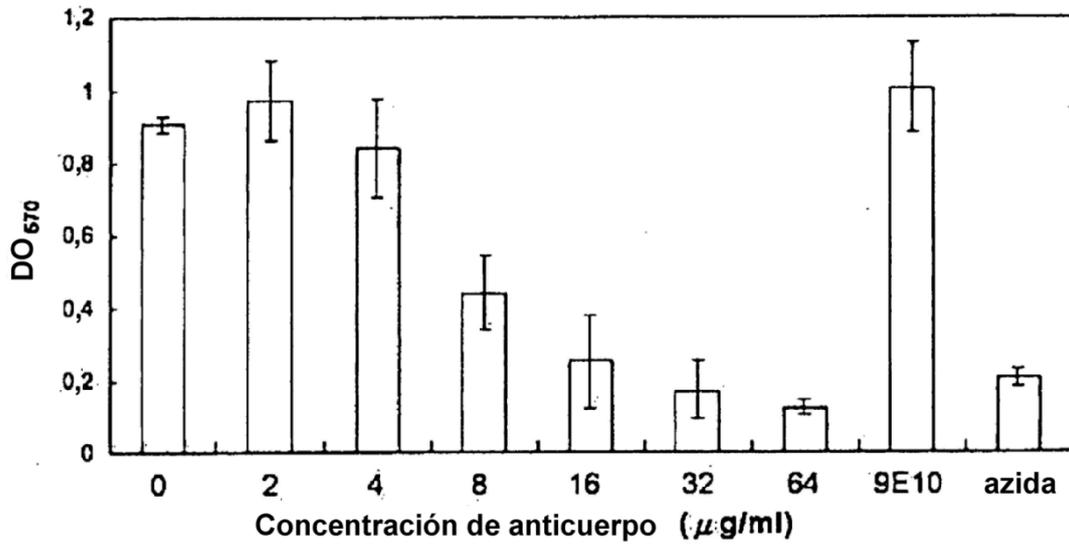
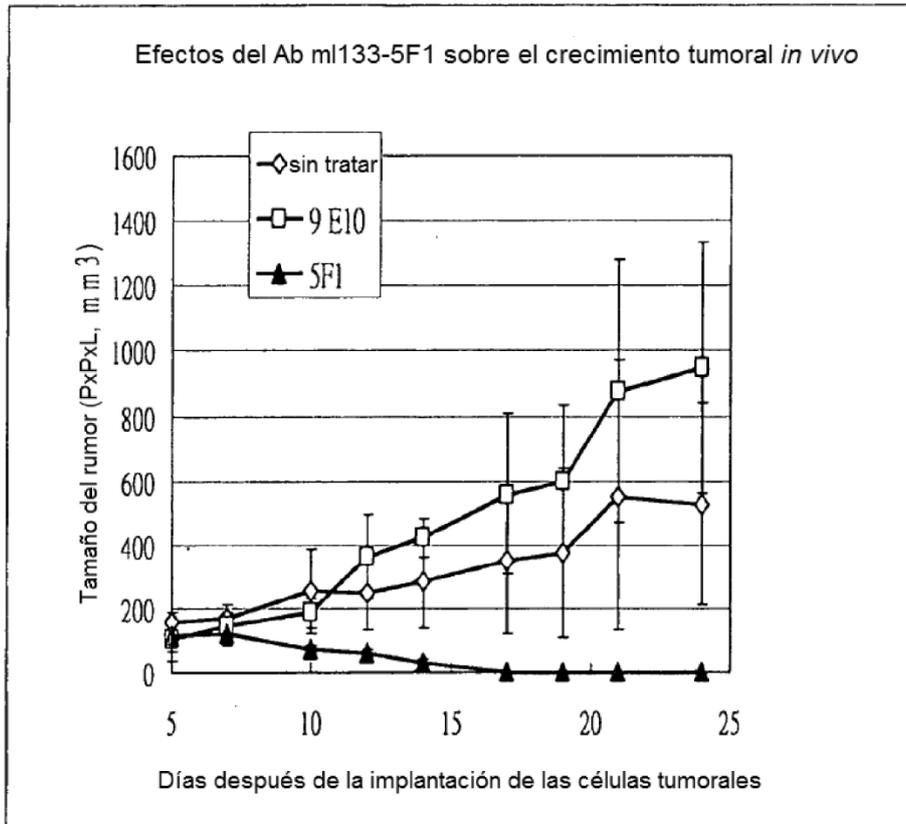


Figura 6



**Figura 7**

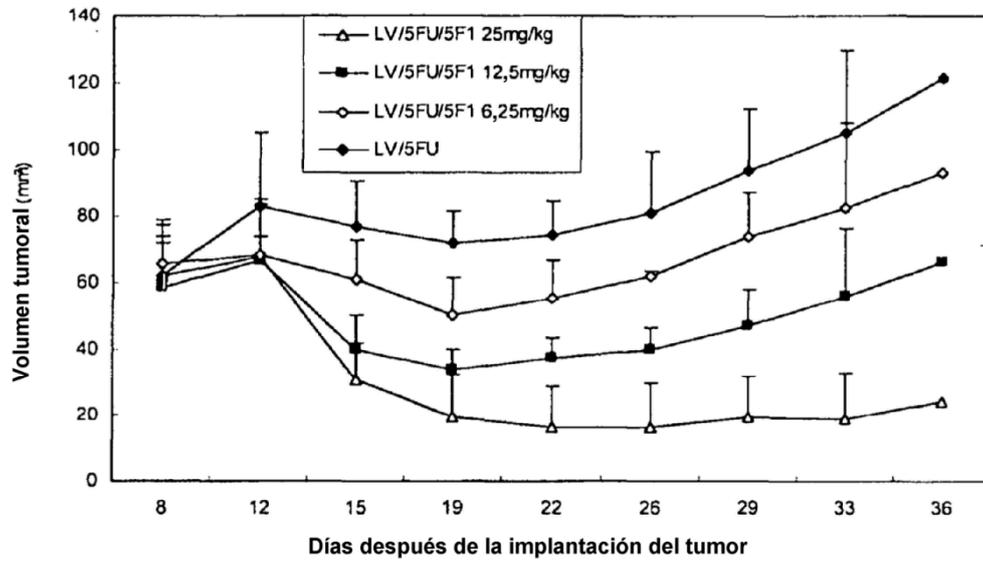


Figura 8

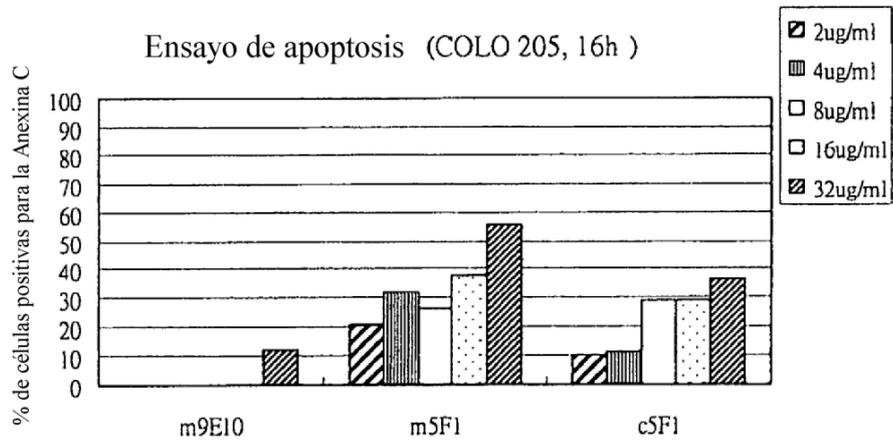
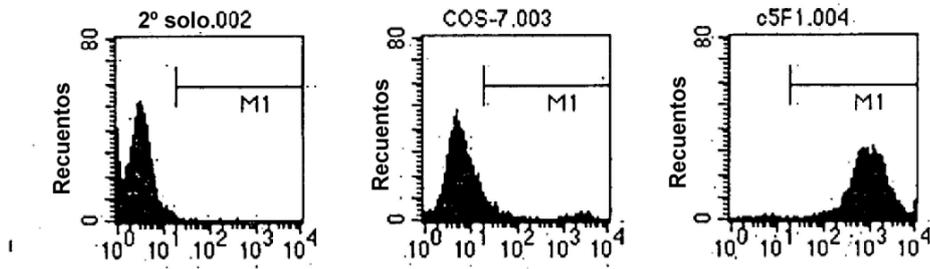


Figura 9

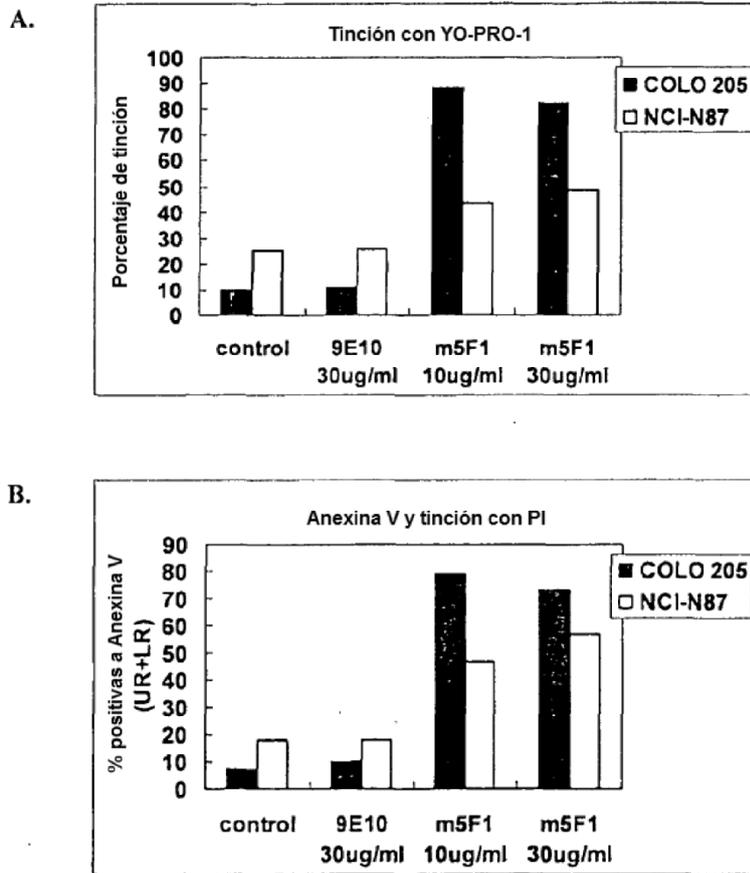
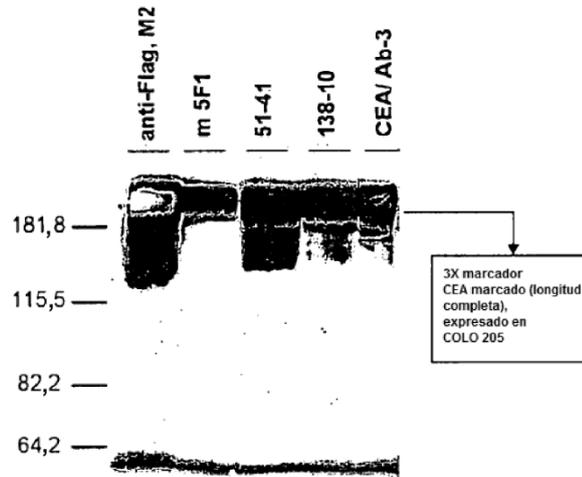


Figura 10

A.



B.

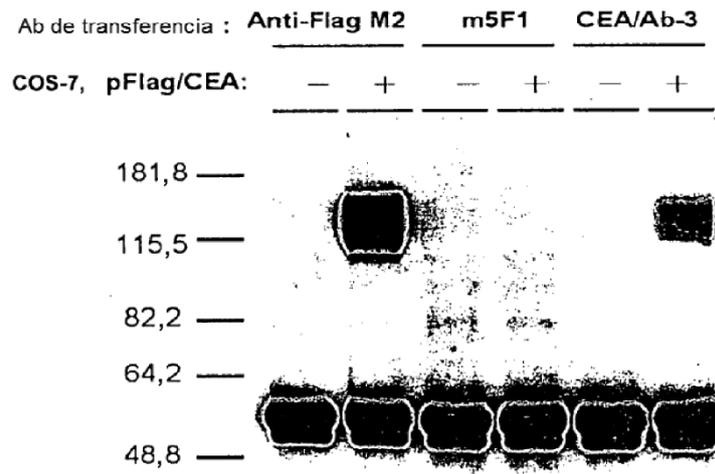
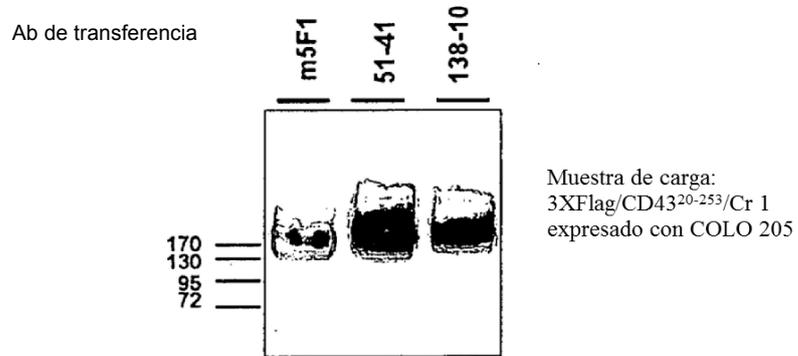


Figura 11

A.



B.

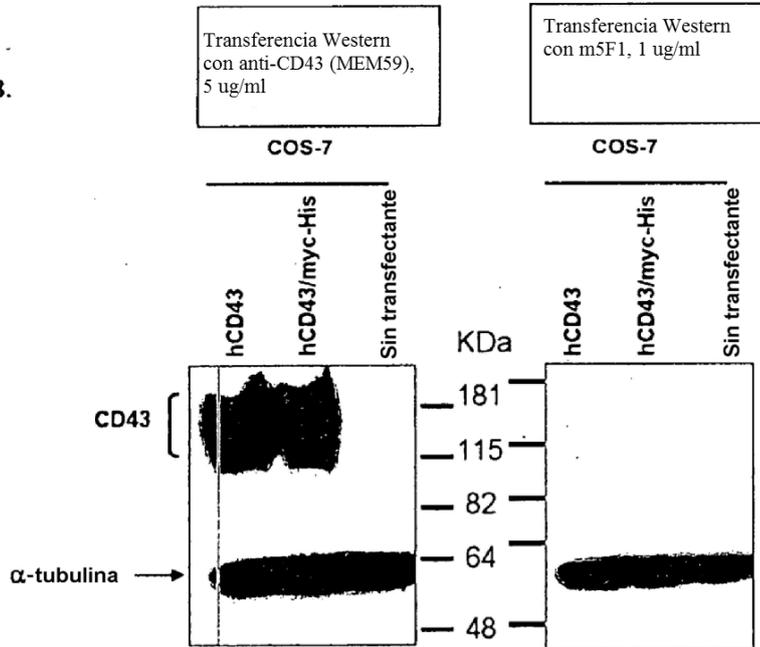


Figura 12

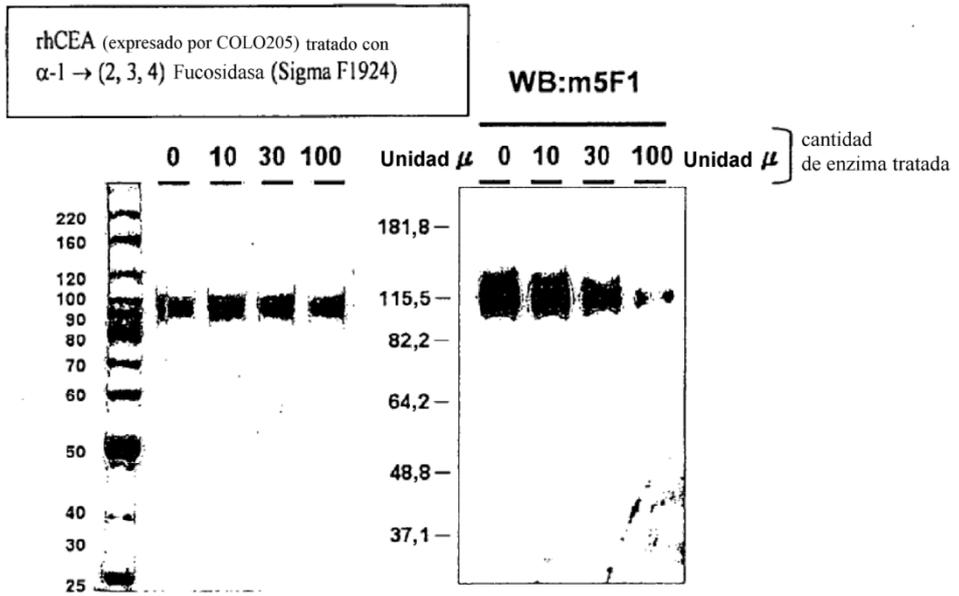


Figura 13

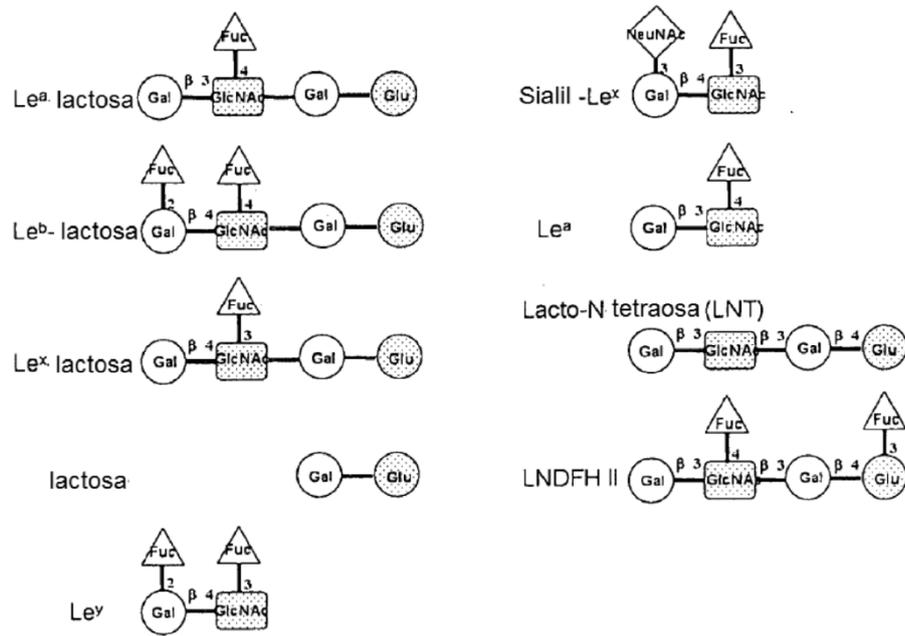


Figura 14

% de inhibición determinado por el  
valor medio de fluorescencia

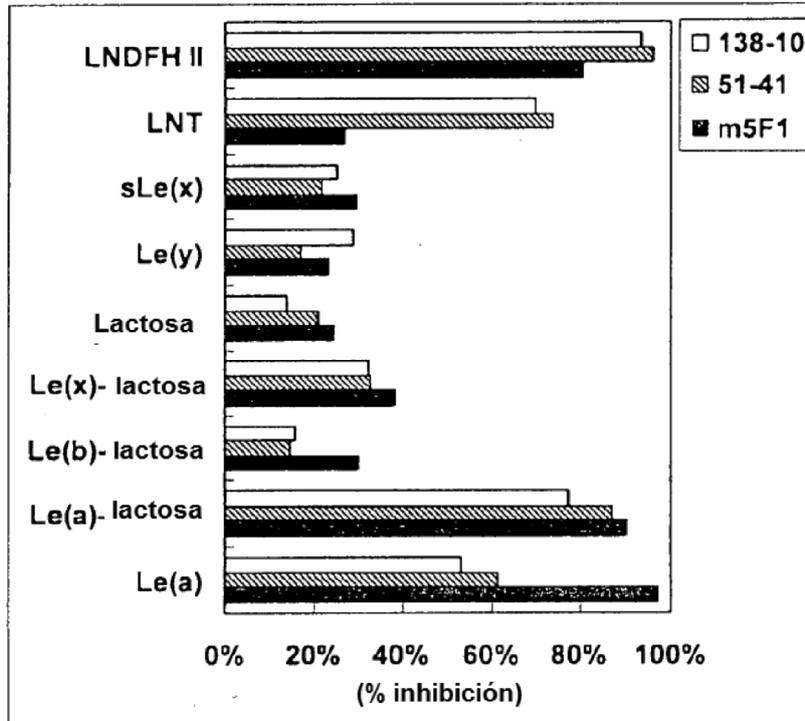


Figura 15