



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 115 626**

⑤① Int. Cl.⁶: C07K 16/28

C12N 5/28

A61K 39/44

C12P 21/08

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **92110841.1**

⑧⑥ Fecha de presentación : **26.06.92**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 520 499**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.92**

⑤④ Título: **Anticuerpo monoclonal humano específico al antígeno de superficie de la membrana de las células cancerosas.**

③⑩ Prioridad: **28.06.91 JP 158859/91**
28.06.91 JP 158860/91
28.06.91 JP 158861/91

⑦③ Titular/es: **Mitsubishi Chemical Corporation**
5-2, Marunouchi 2-Chome
Chiyoda-ku, Tokyo, JP

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.07.98

⑦② Inventor/es: **Hosokawa, Saiko;**
Tagawa, Toshiaki;
Hirakawa, Yoko;
Ito, Norihiko y
Nagaike, Kazuhiro

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.07.98

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humano útil para la diagnosis y la terapia del cáncer, un ADN aislado que codifica el anticuerpo monoclonal, y un hibridoma que produce el anticuerpo. La presente invención también se refiere a una formulación anticancerosa que comprende el anticuerpo unido a un liposoma que contiene un agente anticanceroso.

No existe una formulación anticancerosa hasta ahora, que sea suficientemente eficaz para el tratamiento de los cánceres sólidos. Por otra parte, existía hace mucho tiempo una idea llamada “búsqueda de objetivo” donde un agente terapéutico es concentrado en un tejido u órgano a tratar con el fin de maximizar el efecto terapéutico del agente. Por consiguiente, se espera que el enfoque de un agente anticanceroso a un tejido canceroso por medio de la “búsqueda de objetivo” pueda permitir una terapia del cáncer sólido. Se realizaron numerosas pruebas para concentrar un agente anticanceroso o una toxina en un tejido canceroso hasta que Milstein y Köler (Nature, 1975) establecieron un método para la producción de anticuerpos monoclonales de ratón en grandes cantidades, y algunas de ellas tuvieron éxito.

Hasta ahora, la unión de un anticuerpo a un agente terapéutico ha sido llevada a cabo uniendo directamente un anticuerpo a un agente terapéutico modificado químicamente, o uniéndolos indirectamente a través de un polímero soluble en agua tal como el dextrano. Estos métodos, no obstante, tienen las desventajas de que la cantidad del agente terapéutico capaz de unirse a una molécula de anticuerpo es muy limitada, y de que la modificación química del agente terapéutico a menudo causa la disminución de la actividad terapéutica. Como una de las contramedidas para superar las desventajas, se ha propuesto un nuevo sistema de liberación que consta de un anticuerpo unido a la superficie de un liposoma en el que el agente terapéutico está encapsulado, y se han referido muchos resultados favorables (Konho et al, Cancer Research 47 4471, 1987; Hashimoto et al, Publicación de Patente Japonesa (no examinada) Núm. 134032/1983).

No obstante, los anticuerpos monoclonales de ratón tienen un uso clínico limitado y es imposible la continua administración del mismo desde un punto de vista práctico debido a efectos secundarios tales como la anafilaxis causada por la respuesta inmune (Ver A. Lo Bugli et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86 4220, 1989). Por consiguiente, son preferibles anticuerpos monoclonales humanos en lugar de anticuerpos monoclonales de ratón para el propósito de uso clínico. No obstante, la preparación de anticuerpos monoclonales humanos que reaccionen adecuadamente con células cancerosas ha sido considerada durante mucho tiempo muy difícil debido a las razones de que es muy difícil conducir la inmunidad pasiva con el fin de obtener células B humanas que produzcan un anticuerpo deseado, y de que todavía no se ha establecido ninguna metodología eficaz que permita la infinita reproducción de las células productoras de anticuerpo.

En una situación tal como la mencionada antes, los autores de la presente invención han realizado un estudio extensivo con el fin de obtener un anticuerpo monoclonal humano que permita la “terapia de búsqueda de objetivo” en un tejido u órgano canceroso con la ayuda de agentes anticancerosos o toxinas, y han tenido éxito en la preparación de un hibridoma susceptible de producir un anticuerpo monoclonal humano, cuyo antígeno existe en la superficie de la membrana celular de las células cancerosas. También han tenido éxito en la preparación de una formulación terapéutica útil para la “terapia de búsqueda de objetivo” del cáncer, uniendo el anticuerpo monoclonal de la invención a un liposoma en el que está encapsulado un agente anticanceroso. La presente invención está basada en estos descubrimientos.

Así, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humano específico para un antígeno que existe en la superficie de una membrana de una célula cancerosa, estando producido dicho anticuerpo monoclonal por una célula fusionada entre un linfocito derivado de un paciente con cáncer y una célula de mieloma de ratón. La invención proporciona adicionalmente un gen aislado que codifica el anticuerpo, un hibridoma que produce el anticuerpo, y una formulación anticancerosa que contiene el anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la presente invención contienen, en la región variable de la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 13, 14, y 15. Más específicamente, entre los anticuerpos monoclonales de la invención se incluyen, entre otros, aquellos en los que la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 16, 17, y 18, y la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 19, 20, y 21, y aquellos en los que la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 22, 23, y 24, y la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 25, 26, y 27.

ES 2 115 626 T3

Entre los anticuerpos monoclonales de la invención se incluyen variantes cualesquiera de los anticuerpos específicos anteriormente mencionados, que son obtenibles realizando la inserción, delección, sustitución y/o adición de uno o más restos aminoácido de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anteriormente identificados con las limitaciones de que tal modificación no debe afectar adversamente la reactividad de los anticuerpos contra los antígenos. La presente invención será más detallada más abajo.

En los dibujos adjuntos;

La Fig. 1 muestra esquemáticamente la construcción del vector pKCRD.

La Fig. 2 muestra esquemáticamente la construcción del vector pKCR (Δ E)/H.

La Fig. 3 muestra la reactividad del anticuerpo 1-3-1 con la línea celular C-1 de cáncer de colon.

La Fig. 4 muestra la reactividad del anticuerpo 1-3-1 con la línea celular MKN45 de cáncer gástrico.

La Fig. 5 muestra los efectos anticancerosos del liposoma que contiene adriamicina y modificado con PEG unido al anticuerpo GAH en el cáncer transplantado a ratones carentes de sistema inmune.

El hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano de la invención se prepara según el método descrito por A. Imam (Cancer Research 45 263, 1985). De ese modo, los linfocitos que han sido aislados de nódulos linfáticos asociados con el cáncer son fusionados con células de mieloma de ratón en presencia de polietilenglicol. Los hibridomas así obtenidos se seleccionan por medio de un inmunoensayo enzimático utilizando diferentes líneas celulares cancerosas fijadas con paraformaldehído, y se obtienen y cultivan los hibridomas capaces de producir anticuerpos. A partir del sobrenadante del cultivo resultante, se aíslan y purifican los anticuerpos monoclonales según un método convencional tal como el descrito por R.C. Duhamel (J. Immunol, Methods 31 211, 1979).

El anticuerpo monoclonal purificado es marcado con una sustancia fluorescente y examinada su reactividad con células cancerosas vivas y células normales tales como eritrocitos y leucocitos utilizando Citometría de Flujo. Se seleccionan los hibridomas que producen un anticuerpo que reacciona con las células vivas pero no con las células normales. Alternativamente, la reactividad de los anticuerpos con las células cancerosas aisladas de tejido canceroso de un paciente se compara con la reactividad con células normales derivadas del segmento no canceroso del mismo órgano, y se selecciona un hibridoma que produce un anticuerpo que reacciona con las células cancerosas y no reacciona, o reacciona moderadamente como un anticuerpo derivado de un voluntario normal, con las células normales.

La secuencia de bases de un ADN que codifica un anticuerpo monoclonal humano producido por el hibridoma seleccionado antes puede ser determinada de la siguiente manera.

Según el método de Casara et al (DNA 2 329, 1983), se separan los ARNm de las células de hibridoma productoras de anticuerpo, utilizando tiocianato de guanidina-cloruro de litio, y se prepara la genoteca de ADNc mediante la utilización de un cebador oligo (dT). Se forman las colas (dG) en los ADNc obtenidos de ese modo. La secuencia consenso entre el poli C capaz de hibridar con la cola dG obtenida antes y un gen humano ya disponible que codifica la cadena pesada o ligera de los anticuerpos humanos se utiliza como sonda para la amplificación del ADNc que codifica el anticuerpo por medio de PCR. El extremo del ADN amplificado se hace romo. El ADN separado a partir de un gel de electroforesis es insertado en un vector de clonación tal como pUC119, y la secuencia de bases del ADN se determina mediante el método didesoxi de Sanger et al (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 5463, 1977).

Los anticuerpos preferibles de la presente invención son aquellos en los que la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 13, 14 y 15. Los ejemplos específicos de los anticuerpos preferidos son, entre otros, aquellos en los que la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 16, 17 y 18, y la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 19, 20 y 21, y aquellos en los que la región variable de la cadena pesada comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 22, 23 y 24, y la región variable de la cadena ligera comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 25, 26 y 27.

Las secuencias de aminoácidos antes apuntadas en los Listados de Secuencia Núms. 13, 14 y 15; 16, 17 y 18; y 22, 23 y 24 se denominan "región hipervariable" de la región variable de la cadena pesada.

Asimismo, las secuencias de aminoácidos de los Listados de Secuencia Núms. 19, 20 y 21; 25, 26 y 27 se denominan "región hipervariable" de la región variable de la cadena ligera. Estas regiones son responsables de la especificidad del anticuerpo y determinantes de la afinidad de unión entre el anticuerpo y el determinante antigénico. Por consiguiente, la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos de la invención puede tener diferentes secuencias de aminoácidos derivadas de diferentes anticuerpos en tanto que comprenda las regiones hipervariables anteriormente mencionadas.

Los anticuerpos monoclonales de la invención más preferidos son aquellos en los que las regiones variables de las cadenas pesada y ligera están representadas por las secuencias de aminoácidos de los Listados de Secuencia Núms. 5 y 6 respectivamente, y también 11 y 12 respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera son las mismas que las descritas en Nucleic Acid Research 14 1779, 1986, The Journal of Biological Chemistry 257, 1516, 1982 y Cell 22, 197, 1980, respectivamente.

El anticuerpo monoclonal de la invención puede ser preparado cultivando el hibridoma que produce el anticuerpo de la invención en medio eRDF o RPMI1640 conteniendo suero bovino fetal. Alternativamente, también se puede preparar conectando los ADN que tienen las secuencias de bases de los Listados de Secuencia Núm. 3, 4, 9 y Núm. 10, que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera respectivamente, con ADN conocidos que codifican las regiones constantes mencionadas antes para obtener un par de genes que codifican el anticuerpo monoclonal de la invención, insertando los genes en uno o varios vectores de expresión conocidos, transformando una célula huésped apropiada tal como células CHO con los vectores de expresión, y cultivando el transformante resultante. En cuanto a los vectores de expresión a utilizar en células animales, se puede utilizar convenientemente una combinación de pKCR (ΔE)/H y pKCRD que puede ser construida de la manera mostrada en las Figs. 1 y 2 partiendo de pKCRH₂ descrito por Mishina (Nature 307 605, 1984). Con más detalle, un gen que codifica la cadena pesada, al que se ha añadido un sitio de restricción HindIII, es insertado en el plásmido pKCR (ΔE /H) en el sitio HindIII, y un marcador selectivo tal como el gen DHFR se inserta en el plásmido en el sitio SalI. Por otra parte, un gen que codifica la cadena ligera, al que ha sido añadido en ambos extremos el sitio de restricción EcoRI, se inserta en el plásmido pKCRD en el sitio EcoRI, y después se inserta también el gen DHFR en el plásmido en el sitio SalI. Los dos plásmidos obtenidos antes se incorporan a una célula huésped tal como CHO dhfr⁻ (Urlaub G. & Chasin L.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 4216, 1980) por medio del método del fosfato de calcio. El transformante resultante se cultiva en medio α MEM que no contiene nucleótidos, y las células desarrolladas se someten a una selección adicional para los clones productores de anticuerpo. El anticuerpo de la invención puede ser obtenido y purificado cultivando el clon seleccionado, adsorbiendo el sobrenadante resultante a una columna cargada con Proteína A soportada por cerulofina o agarosa, y haciendo eluir el anticuerpo de la columna.

El liposoma utilizado para la preparación de la formulación anticancerosa de la invención está compuesto de dos capas lipídicas. La capa lipídica puede ser monocapa o de capas múltiples. Los constituyentes del liposoma son la fosfatidilcolina, el colesterol, la fosfatidiletanolamina, etc. También se puede añadir ácido fosfatídico, que proporciona la carga eléctrica al liposoma. Las cantidades de estos constituyentes utilizados para la producción del liposoma son, por ejemplo, 0,3-1 moles, preferiblemente 0,4-0,6 moles de colesterol, 0,01-0,2 moles, preferiblemente 0,02-0,1 moles de fosfatidiletanolamina, 0,0-0,4 moles, preferiblemente 0-0,15 moles de ácido fosfatídico por 1 mol de fosfatidilcolina.

El liposoma utilizado en la presente invención puede ser preparado mediante métodos convencionales. Por ejemplo, una mezcla de los lípidos mencionados antes, de la cual han sido eliminados los disolventes, se emulsiona mediante la utilización de un homogeneizador, se liofiliza, y se funde para obtener un liposoma multímero. El ajuste del tamaño de partícula de los liposomas resultantes puede ser conducido mediante ultrasonificación, homogeneización de alta velocidad, o filtración a presión a través de una membrana que tiene un tamaño de poro uniforme (Hope M.J. et al., Biochimica et Biophysica Acta 812 55, 1985). El tamaño de partícula preferible de los liposomas está entre 30 nm y 200 nm.

Entre los agentes anticancerosos encapsulados en el liposoma se incluyen los agentes carcinostáticos tales como la adriamicina, la daunomicina, la mitomicina, la cisplatina, la vincristina, la epirrubicina, el metotrexato, el 5Fu, y la aclacinomicina, las toxinas tales como la ricina A y la toxina de la difteria, y el ARN antisentido. La encapsulación de los agentes anticancerosos en el liposoma se lleva a cabo mediante la hidratación de los lípidos con la solución acuosa del agente anticanceroso. La adriamicina, la daunomicina, y la epirrubicina pueden ser encapsuladas en un liposoma por medio de un método de carga a distancia aprovechando el gradiente de pH (Lawrence D.M et al., Cancer Research 49 5922, 1989).

La unión de un anticuerpo monoclonal a la superficie del liposoma mencionado antes se puede llevar a

cabo mediante la formación de un enlace cruzado entre la fosfatidiletanolamina y el anticuerpo utilizando glutaraldehído. No obstante, el método preferido es aquel en el que se deja reaccionar un anticuerpo tiolado con un liposoma que contiene un lípido al que se ha incorporado un grupo maleimido. Se pueden hacer reaccionar adicionalmente los grupos maleimido restantes sobre la superficie del liposoma con un compuesto que contiene un radical de polialquilenglicol tiolado, con lo cual se modifica la superficie del liposoma.

La tiolación del anticuerpo se puede dirigir mediante la utilización de N-succinimidil-3-(2-piridiltio)-propionato (SPDP), que se utiliza usualmente para la tiolación de proteínas, iminotiolano, o mercaptoalquilimidato. Alternativamente, un grupo ditiol intrínseco a un anticuerpo puede ser reducido para formar un grupo tiol. Se prefiere lo último desde el punto de vista del mantenimiento de la función del anticuerpo. Otro método para proporcionar un anticuerpo con un grupo tiol es aquel en el que un anticuerpo se trata con una enzima tal como la pepsina para formar F(ab)'₂, que después es reducido con ditiotreitól (DTT) para formar Fab', lo que da de uno a tres grupos tiol.

La unión del anticuerpo tiolado al liposoma que contiene el grupo maleimido se puede llevar a cabo haciéndolos reaccionar en una solución tampón neutra a pH 6,5-7,5 durante 2 a 16 horas.

La formulación anticancerosa de la presente invención puede ser preparada mediante métodos convencionales tales como el método de deshidratación (Publicación de Patente Japonesa Núm. 502348/1990) y el método de liofilización (Publicación de Patente Japonesa Núm. 9331/1989).

La formulación anticancerosa de la invención puede ser administrada intravascularmente, peritonealmente, o localmente. La dosificación de la formulación varía dependiendo de la naturaleza del agente anticanceroso concreto encapsulado en el liposoma. Cuando el agente es la adriamicina, la dosificación es la que corresponde a 50 mg de adriamicina o menos/kg de peso corporal, preferiblemente 10 mg o menos/kg, más preferiblemente 5 mg o menos/kg.

Los siguientes ejemplos detallados son presentados a modo de ilustración de algunas realizaciones específicas de la presente invención.

Ejemplo 1

Creación de un Hibridoma Productor del Anticuerpo Monoclonal Humano GAH

El hibridoma productor del anticuerpo monoclonal humano GAH fue creado mediante la fusión celular entre linfocitos derivados de un nódulo linfático asociado con tejido canceroso de un paciente y células de mieloma de ratón.

(1) *Preparación de los Linfocitos*

Se cortó en pequeños pedazos un nódulo linfático asociado con el cáncer extraído de un paciente que padecía cáncer de colon con tijeras y escalpelo, y las células fueron dispersadas con una malla inoxidable en Medio de Cultivo A (eRDF (Kyokuto Seiyaku Kogyo) + 50 µg/ml de sulfato de gentamicina). La suspensión celular resultante fue centrifugada a 1.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue descartado. El residuo fue suspendido en Medio de Cultivo A de nueva aportación, y la suspensión fue centrifugada de nuevo para obtener $2,6 \times 10^7$ células.

(2) *Fusión Celular*

Los linfocitos obtenidos antes fueron sometidos a fusión celular con células de mieloma de ratón (1×10^7) en presencia de polietilenglicol (Boehringer-Mannheim) según un método convencional. Las células fusionadas fueron suspendidas en Medio de Cultivo A añadido con hipoxantina 10 µM, aminopterina 0,04 µM, timidina 1,6 µM, y suero bovino fetal (FCS) al 10%, siendo referido dicho medio de aquí en adelante como medio de adición HAT, de manera que la densidad de linfocitos sea de $5,4 \times 10^5$ /ml. La suspensión fue cultivada en placa sobre placas de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y cultivada a 37°C en una incubadora con CO₂. La mitad del medio de cultivo fue sustituida por medio de adición HAT de vez en cuando y se continuó cultivando hasta que aparecieron las colonias de hibridomas. Se observaron colonias de hibridomas en todos los pocillos. Se sometió a ensayo la reactividad del sobrenadante de cultivo de cada pocillo con diferentes líneas celulares cancerosas establecidas tal como la línea celular de cáncer de colon C-1 (Sato et al, Igakunoayumi (Progress of Medicine) 96 876, 1976, obtenida de Men Eki Seibutsu Kenkyusho (Institute of Immunized Organisms)), y la línea celular de cáncer de estómago MKN45 (Naito

et al, Gan to Kagaku Ryoho (Cancer and Chemotherapy) 5 89, 1978, obtenida del Instituto apuntado antes) según el método descrito en el Experimento 1. Los pocillos positivos fueron el 7,3% (35 pocillos) contra C-1 y el 4,6% (22 pocillos) contra MKN45, y 6 pocillos mostraron reacción positiva contra ambas cepas. La clonación de hibridomas se llevó a cabo utilizando los pocillos que mostraron reacción positiva frente a ambas líneas. La clonación se llevó a cabo tres veces por medio del método de dilución limitante, y se creó el clon GAH del hibridoma.

Ejemplo 2

10 *Purificación y Marcaje del Anticuerpo Monoclonal GAH*

(1) *Cultivo del Hibridoma GAH y Purificación del Anticuerpo Monoclonal GAH*

Se hizo pasar suero bovino fetal a través de Proteína A-agarosa (RepliGen), con lo cual se separaban del suero las sustancias absorbidas a la columna. Para el cultivo del hibridoma GAH, se utilizó medio de cultivo eRDF (Kyokuto Seiyaku) al que se había añadido el 3% del suero anterior. El cultivo del hibridoma GAH se cargó después en una columna de Proteína A-agarosa, y el anticuerpo adsorbido se hizo eluir para obtener el anticuerpo purificado. La utilización del suero antes apuntado permitía obtener el anticuerpo GAH puro libre de otros anticuerpos del suero de origen y de otras sustancias adsorbidas a la Proteína A-agarosa. Se confirmó que el anticuerpo GAH era una IgG pura mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio.

(2) *Marcaje Fluorescente del Anticuerpo GAH*

El anticuerpo GAH purificado fue marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) según el método de Coons A.H. De ese modo, el anticuerpo fue sometido a diálisis frente a una solución tampón de carbonato (pH 9,5) y se hizo reaccionar con la solución de FITC. El anticuerpo marcado se separó del FITC libre mediante filtración en gel. Se midió la absorbancia de las fracciones que contenían el anticuerpo marcado a DO_{280nm} y DO_{495nm} y se determinó el grado de marcaje. La razón molar de unión del anticuerpo y el FITC (razón F/P) fue 0,93.

Experimento 1

Estudio sobre la Reactividad del Anticuerpo Monoclonal Humano con las Líneas Celulares Cancerosas

35 (1) *Líneas Celulares Cancerosas y Preservación de las Mismas*

Se utilizaron la línea celular de cáncer de colon C-1 y la línea celular de cáncer de estómago MKN45 como líneas celulares cancerosas humanas. Las células fueron preservadas y desarrolladas a 37°C en condiciones con el 5% de CO₂ utilizando el Medio de Cultivo B (medio eRDF conteniendo FCS al 10%).

(2) *Estudio sobre la Reactividad de las Líneas Celulares Cancerosas*

a. *Determinación de la reactividad frente a líneas celulares cancerosas sólidas*

Se cultivaron células cancerosas hasta una monocapa en una placa de 96 pocillos durante 3 o 4 días. Tras la separación del sobrenadante de cultivo, la placa fue lavada dos veces con una solución de tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) y NaCl 0,15 M (PBS), y la fijación del paraformaldehído al 2% se llevó a cabo a la temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de lavar 5 veces con PBS, se añadió a los pocillos una solución de PBS conteniendo BSA (seralbúmina bovina) al 5% (200 μ /pocillo), y la placa se mantuvo a 37°C durante 2 horas para completar el bloqueo. La placa se lavó 5 veces con PBS, y a esto se añadieron 50 μ l de sobrenadante de cultivo del hibridoma. Después de una reacción de dos horas a 37°C, la placa se lavó 5 veces con PBS y se añadieron 50 μ l de anticuerpo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina al anticuerpo humano (dilución 1.000, Capel). Tras una hora de reacción a 37°C, la placa se lavó 5 veces con PBS y se añadió tampón carbonato 0,05 M - MgCl 1 mM (pH 9,5) conteniendo fosfato de p-nitrofenilo 25 mM a una razón de 50 μ l/pocillo y se dejó reaccionar a la temperatura ambiente durante una hora durante la noche. Se midió la absorbancia a 405 nm con un fotómetro de microplaca (Colona). La reactividad fue determinada según el método descrito en el Ejemplo 1 (2). La clonación a partir los pocillos en los que se ha observado reacción positiva contra las líneas celulares cancerosas cultivadas C-1 y MKN45 daba el hibridoma GAH. El anticuerpo purificado del sobrenadante de cultivo de GAH mostraba la misma reactividad.

b. *Reactividad con células cancerosas vivas*

Se cultivaron células cancerosas en un matraz o placa Petri y se descartó el sobrenadante de cultivo. Al residuo se añadió solución de PBS conteniendo EDTA al 0,02 %, y la mezcla se dejó estar a la temperatura ambiente durante 30 minutos permitiendo flotar las células. Las células fueron lavadas con Medio de Cultivo B mediante centrifugación y suspendidas en suero humano sano conteniendo el anticuerpo GAH marcado con fluorescencia (concentración final: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) obtenido en el Ejemplo 2 (2) de manera que se pueda obtener una densidad celular de aproximadamente $1 \times 10^6/200 \mu\text{l}$, y se dejó reaccionar la suspensión a 0°C durante 60 minutos. La suspensión se centrifugó a 2.000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células restantes se suspendieron en 1 ml de PBS, se lavaron mediante centrifugación, y se resuspendieron en 300 μl de PBS conteniendo 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de yoduro de propidio (PI). La suspensión se sometió a observación mediante citometría de flujo (FCM), FACS440 (Becton Dickinson), con el fin de determinar la magnitud de la fluorescencia (FITC y PI) unida a células concretas. Las células muertas que tenían fluorescencia PI podrían ser separadas puesto que las células muertas tomaban PI en los ácidos nucleicos y emitían fluorescencia PI. Los marcadores que tenían cinco cantidades patrón de fluorescencia (equipo reactivo cuantitativo: Ortho Diagnostic Systems) fueron sometidos a FCM en las mismas condiciones que antes. Basándose en los marcadores, se calculó la cantidad de unión media de FITC por célula. En base a la cantidad de unión media y a la razón F/P de anticuerpo marcado, se determinó el número medio de anticuerpos unidos a una célula viva. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Cepa de Células Cancerosas	Anticuerpo	
	GAH	IgG Control
MKN45	$3,5 \times 10^4$	$0,15 \times 10^4$
C-1	$0,6 \times 10^4$	$<0,1 \times 10^4$

Cuando se comparaba con la IgG derivada de suero humano sano, que estaba marcada mediante fluorescencia de la misma manera que GAH y se utilizaba como control, se había unido una cantidad 6-23 veces mayor de anticuerpo GAH a las células de cáncer de estómago y colon.

Experimento 2

Reactividad del Anticuerpo Monoclonal Humano GAH con Células de la Sangre

Se separaron eritrocitos de sangre periférica tomada de 7 voluntarios sanos y 3 pacientes que padecían cáncer según el método de Kinoshita (Separación de Eritrocitos); Nueva Edición de Nippon Ketsuekigaku Zensho 13 800, 1979).

Los leucocitos fueron obtenidos de la siguiente manera: Se extrajo sangre periférica de voluntarios sanos con adición de heparina. Se añadieron 2 ml de solución salina fisiológica - dextrano al 6 % y se mezclaron con 10 ml de sangre. La mezcla se dejó estar a la temperatura ambiente durante 50 minutos para dar una capa de plasma, que después se separó y centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos para obtener leucocitos.

Se determinaron las reactividades del anticuerpo monoclonal de la invención de estas células sanguíneas por medio de FCM de la misma manera que en las células cancerosas vivas excepto que no se añadió PI. Con respecto a esto, los leucocitos fueron divididos en linfocitos (célula leucocítica principal), granulocitos, monocitos, y plaquetas, en base a la dispersión frontal y lateral de la luz en FCM (Bio/Technology 3 337, 1985), y las reactividades de las células respectivas fueron determinadas separadamente. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Células	Anticuerpo	
	GAH	IgG Control
Leucocito		
linfocito	negativo	negativo
granulocito	0,49 x 10 ⁴ *	0,48 x 10 ⁴ *
monocito	0,41 x 10 ⁴ *	0,43 x 10 ⁴ *
plaqueta	negativo	negativo
Eritrocito	negativo	negativo

*: Número medio de anticuerpos unidos por célula

El anticuerpo GAH no mostraba reacción con eritrocitos y linfocitos, mientras que la reactividad con granulocitos y monocitos estaba en el mismo nivel que la reactividad con la IgG de control del mismo modo que en el Experimento 1.

Experimento 3

Reactividad del Anticuerpo Monoclonal Humano GAH con Células Derivadas de Tejido Canceroso y Tejido no Canceroso Reciente

Con el fin de estudiar la especificidad de unión del anticuerpo GAH a las células cancerosas, se aislaron simultáneamente células normales a partir de tejido reciente perteneciente al mismo órgano del mismo paciente del cual se obtuvieron las células cancerosas, y se determinaron las reactividades del anticuerpo GAH con las respectivas células. El aislamiento de las células del tejido se llevó a cabo según el método de Tokita (Ganno Rinsho (Cancer in Clinic) 32 1803, 1986).

Así, el tejido extraído se colocó en una lámina de teflón extendida sobre una placa de caucho, se cortó con una navaja en pequeños pedazos, y se transfirió a mallas inoxidables de 1 mm. Las mallas fueron sacudidas en una placa Petri llena de medio de cultivo para obtener el medio conteniendo pequeños agregados celulares que pasaban a través de las mallas. El medio fue centrifugado a 1.000 rpm, y se descartaron las grasas flotantes y los desechos necróticos en suspensión. Esta centrifugación se repitió varias veces. Los agregados celulares se bombearon por medio de una jeringa con una aguja Cateran del calibre 23 para dispersar las células. La reactividad con las células obtenidas de ese modo fue determinada mediante FCM de la misma manera que en las células cancerosas vivas. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Anticuerpo	Colon		Estómago	
	Células Cancerosas	Células No cancerosas	Células Cancerosas	Células No cancerosas
GAH	1,1 x 10 ⁴	0,03 x 10 ⁴	180 x 10 ⁴	4,6 x 10 ⁴
IgG de Control	0,15 x 10 ⁴	0,04 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁴	0,9 x 10 ⁴

Número medio de anticuerpos unidos por célula

El número medio de anticuerpos GAH unidos a las células cancerosas es notablemente más alto que en las células no cancerosas. Además, número de anticuerpos unidos a las células cancerosas era 51 veces mayor que en la IgG de control en el cáncer de estómago, y 7 veces mayor en cáncer de colon. Estos resultados indican que el anticuerpo GAH reconoce un antígeno expresado predominantemente en la superficie de la membrana celular de las células cancerosas.

Ejemplo 3

(1) *Determinación de la Subclase de la Cadena Ligera del Anticuerpo Monoclonal GAH*

5 El anticuerpo GAH obtenido en el Ejemplo 2 (1) fue sometido a SDS-PAGE en forma reducida. La cadena pesada y la cadena ligera sometidas a electroforesis separadamente se transfirieron a una membrana de transferencia (Polyvinylidene-difluoride, Millipore). La membrana fue bloqueada con una solución de SAB al 5% y se dejó reaccionar con anticuerpo de cabra para la cadena κ o λ humana, que se había combinado con peroxidasa (Capel). Después de lavar, una solución de 4-cloronaftol al 0,05% (p/v) conteniendo H₂O₂ al 0,015% se dejó reaccionar con eso como sustrato. La cadena ligera del anticuerpo GAH
10 reaccionaba con el anticuerpo anti-cadena κ humana, que era detectada por la aparición de una banda coloreada. Esto revelaba que la cadena ligera era la cadena κ .

(2) *Preparación del Gen que Codifica el Anticuerpo Monoclonal GAH*

15

a. *Preparación del ADNc que codifica el anticuerpo GAH por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

20 Según el método detallado antes, se prepararon ARN conteniendo poli(A) a partir del hibridoma productor del anticuerpo GAH obtenido en el Ejemplo 1(2) utilizando el método del tiocianato de guanidina-cloruro de litio (DNA 2 329, 1983).

Las células de hibridoma (1×10^7) fueron solubilizadas en una solución (7,5 ml) comprendiendo tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, y β -mercaptoetanol al 8% (v/v).
25 A la mezcla se añadió adicionalmente cloruro de cesio hasta la concentración final de 1 g/2,5 ml y se mezcló. Una solución de cloruro de cesio 5,7 M (3,5 ml) se cubrió con una capa de la solución (8,0 ml) en un tubo de centrífuga, y se centrifugó a 30.000 rpm durante 3,5 horas utilizando un Hitachi RPS40T Rotary, que daba los ARN en forma de precipitado. El precipitado se disolvió en una solución (400 μ l) comprendiendo lauril-sulfato de sodio al 0,1%, EDTA 1 mM, y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, seguido de
30 extracción en fenol-cloroformo y precipitación en etanol. Los ARN resultantes (aproximadamente 64 μ g) se disolvieron en una solución (40 μ l) comprendiendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, y EDTA 1 mM. Una alícuota de 21 μ l de la solución proporcionaba 2,64 μ g aproximadamente de ARNm conteniendo poli(A) por medio del mRNA PURIFICATION KIT (Pharmacia). El ARNm conteniendo poli(A) (1,1 μ g) se disolvió en agua (10 μ l). A la solución se añadieron cebador oligo d(T) 12-18 (1,5 μ g) (Pharmacia), 4
35 dNTP 10 mM (3 μ l) (Takara Shuzo), transcriptasa inversa (40 U) (Life Science), inhibidor de la ARNasa (30 U) (Takara Shuzo), 5 x tampón para transcriptasa inversa (6 μ l) comprendiendo Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, cloruro de magnesio 40 mM, y cloruro de potasio 250 mM, y adicionalmente agua para hacer un volumen total de 30 μ l. La mezcla se dejó reaccionar a 41°C durante 1 hora, seguido de precipitación en etanol para obtener ADNc.

40

El ADNc obtenido de ese modo se disolvió en agua (15,3 μ l). A la solución se añadió 5 x tampón para desoxinucleótido transferasa terminal (4,8 μ l) (Tris-HCl 250 mM, pH 7,5, cloruro de magnesio 50 mM), desoxinucleótido transferasa terminal (12 U) (Pharmacia), y dGTP 10 mM (2,4 μ l) (Takara Shuzo) para hacer un volumen total de 24 μ l, y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1,5 horas para añadir poli
45 d(G) al extremo 3' del ADNc. Una vez completada la reacción, las enzimas fueron inactivadas calentando a 70°C durante 15 minutos.

La PCR se llevó a cabo en base al ADNc así obtenido como molde utilizando Perkin Elmer Cetus DNA THERMAL CYCLER siguiendo el manual suministrado por el fabricante. De ese modo, a la mezcla
50 de reacción anterior (2 μ l) se añadieron, como cebador para amplificar el ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada, poli C (15 nucleótidos) que hibrida con la cola dG añadida al extremo 3' del ADNc (40 pmol), un cebador de ADN de hebra sencilla (37 nucleótidos) correspondiente a la región que se extiende desde parte de la región variable (secuencia de aminoácidos 113-119 del Listado de Secuencia Núm. 5) hasta la región constante que es común a todas la IgG humanas, mostrada en el
55 Listado de Secuencia Núm. 1 (25 pmoles) (Nucleic Acid Research 14 1779, 1986), poli C como cebador para amplificar el ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera (40 pmoles), un cebador de ADN de hebra sencilla (21 nucleótidos) correspondiente a la región que se extiende desde la región J de la cadena κ humana (secuencia de aminoácidos 113-114 del Listado de Secuencia Núm. 6) hasta la región constante, mostrada en el Listado de Secuencia Núm. 2, (The Journal of Biological Chemistry 257
60

1516, 1982; Cell 22 197, 1980) (40 pmoles), 10 x tampón para PCR (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, cloruro de potasio 500 mM, cloruro de magnesio 15 mM, gelatina al 0,1% (p/v) (10 μ l), 4 dNTP 10 mM (2 μ l) (Takara Shuzo), y ADN polimerasa Taq (2,5 U) (Takara Shuzo)), y adicionalmente agua para hacer un volumen final de 100 μ l. Se llevaron a cabo treinta ciclos de incubaciones a 94°C durante un minuto (etapa de desnaturalización) a 55°C durante dos minutos (etapa de templado) y a 72°C durante tres minutos (etapa de elongación) y se añadió una incubación adicional a 72°C durante siete minutos. La mezcla de reacción se sometió a precipitación en etanol, y los precipitados resultantes se disolvieron en agua (30 μ l).

10 A la solución acuosa se añadieron fragmento de Klenow (2 U) (Takara Shuzo), 4 dNTP 1 mM (4 μ l), y 10 x tampón para la formación de extremos romos (Tris-HCl 500 mM, pH 7,6, cloruro de magnesio 100 mM) (4 μ l), 40 μ l en total, y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 30 minutos para obtener un ADNc de doble hebra que tenía los extremos romos.

15 b. *Determinación de la secuencia de bases del ADNc*

La solución de ADNc obtenida antes fue sometida a electroforesis en agarosa al 2%, y se observó una banda a aproximadamente 500 pb. La banda se separó cortándola del gel de agarosa. El ADNc fue insertado en un vector de clonación pUC119 en el sitio SmaI, y la secuencia de bases se determinó mediante el método didesoxi, lo que revelaba que entre la secuencia de bases total del fragmento PCR, las secuencias de bases que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera eran respectivamente las mostradas en los Listados de Secuencias Núms. 3 y 4.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo GAH producido por el hibridoma antes mencionado fueron deducidas a partir de las secuencias de bases determinadas antes y se muestran respectivamente en los Listados de Secuencia Núms. 5 y 6. Basándose en las secuencias de bases determinadas, el anticuerpo GAH demostró pertenecer a la subclase IgG1. El fragmento de ADN, cuya la secuencia de bases ha sido determinada, puede ser preparado por medio de un sintetizador de ADN con buena reproducibilidad, y por lo tanto, la adquisición del fragmento de ADN no requiere la repetición del procedimiento anterior.

Ejemplo 4

35 *Creación del Hibridoma que Produce el Anticuerpo Monoclonal Humano 1-3-1 mediante Fusión Celular entre Linfocitos Derivados de Nódulos Linfáticos Asociados con Cáncer y Mieloma de Ratón*

(1) *Preparación de los Linfocitos*

40 En sustancial acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 (1), se prepararon linfocitos (3 x 10⁷) partiendo de nódulos linfáticos asociados con cáncer extraídos de un paciente con cáncer de pulmón.

(2) *Fusión Celular*

45 Las células linfocíticas obtenidas antes fueron fusionadas con células de mieloma de ratón (8 x 10⁶) utilizando polietilenglicol (Boehringer-Mannheim) según el método convencional. De la misma manera que en el Ejemplo 1 (2), las células fusionadas fueron suspendidas en medio de adición HAT para obtener una densidad celular de 5,2 x 10⁵/ml y se colocaron en una placa de 96 pocillos a una razón de 100 μ l/placa. La mitad del medio de cultivo fue sustituida por medio de adición HAT de vez en cuando y el cultivo continuó hasta que aparecieron colonias de hibridoma. Se observaron colonias de hibridoma en todos los pocillos. De la misma manera que en el Ejemplo 1 (2), se sometió a ensayo la reactividad del sobrenadante de cultivo de cada pocillo con líneas celulares cancerosas fijadas tales como la línea celular de cáncer de colon C-1 y la línea celular de cáncer de estómago MKN45, según el procedimiento descrito en el Experimento 1 (2)-a. Los pocillos positivos fueron el 16,3% (94 pocillos) contra C-1 y el 6,3% (36 pocillos) contra MKN45, y 4 pocillos mostraron reacción positiva con ambas líneas.

55 La clonación de las células de hibridoma fue llevada a cabo utilizando los pocillos que mostraban reacción positiva con ambas líneas. La clonación fue llevada a cabo tres veces por medio del método de dilución limitante, y se creó el clon del hibridoma 1-3-1.

60

ES 2 115 626 T3

Ejemplo 5

Purificación y Marcaje del Anticuerpo Monoclonal 1-3-1

5 (1) *Cultivo del Hibridoma 1-3-1 y purificación del Anticuerpo Monoclonal 1-3-1*

Para el cultivo del hibridoma 1-3-1, se utilizó el medio de cultivo eRDF (Gokuto Seiyaku) al que se había añadido el 3% del suero descrito en el Ejemplo 2 (1). El cultivo del hibridoma 1-3-1 se cargó después en una columna de Proteína A-agarosa, y el anticuerpo adsorbido fue eluido después para obtener el anticuerpo purificado 1-3-1. se confirmó que el anticuerpo era una IgM pura mediante SDS-PAGE.

(2) *Marcaje Fluorescente del Anticuerpo 1-3-1*

El anticuerpo purificado 1-3-1 fue marcado con FITC según el método descrito en el Ejemplo 2 (2). La absorbancia de las fracciones que contenían el anticuerpo marcado fue medida a DO_{280nm} y DO_{495nm} , y se determinó el grado de marcaje. La razón F/P era 6,7.

Experimento 4

20 *Estudio de la Reactividad del Anticuerpo Monoclonal Humano con Líneas Celulares Cancerosas*

(1) *Líneas Celulares Cancerosas y Conservación de las Mismas*

La línea celular de cáncer de colon C-1 y la línea celular de cáncer de estómago MKN45 humanas se conservaron y desarrollaron a 37°C y en condiciones con el 5% de CO₂ en Medio de Cultivo B de la misma manera que se ha descrito en el Experimento 1 (1).

(2) *Estudio de la Reactividad con Líneas Celulares Cancerosas Vivas*

Se cultivaron células cancerosas en un matraz o en una placa Petri y se descartó el sobrenadante de cultivo. Al residuo se añadió solución PBS conteniendo EDTA al 0,02%, y la mezcla se dejó estar a la temperatura ambiente durante 30 minutos dejando flotar las células. Las células fueron lavadas con Medio de Cultivo B mediante centrifugación y se suspendieron en PBS para tener una densidad celular de aproximadamente $1 \times 10^6/200 \mu l$. El anticuerpo 1-3-1 obtenido en el Ejemplo 5 (1) se añadió a la solución anterior para tener una concentración final de anticuerpo de 50 $\mu g/ml$, y la mezcla se dejó reaccionar a 0°C durante 60 minutos. La suspensión se centrifugó a 2.000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. A las células restante se añadió una solución de anticuerpo anti-humano marcado con FITC (200 μl) (Capel) diluida con PBS conteniendo BSA al 1% 500 veces, y la suspensión celular resultante se mantuvo a 0°C durante 60 minutos. La suspensión se centrifugó a 2.000 rpm durante 2 minutos para separar el sobrenadante, y las células restantes se suspendieron y se lavaron con PBS (1 ml) mediante centrifugación, y las células se suspendieron finalmente en PBS (300 μl) conteniendo PI (10 $\mu g/ml$). La suspensión celular resultante se sometió a FCM, y se determinó la magnitud de la fluorescencia (FITC y PI) unida a células concretas. Las reactividades del anticuerpo 1-3-1 con la línea celular de cáncer de colon C-1 y la línea celular de cáncer de estómago MKN45 se muestran respectivamente en las Figs. 3 y 4 de los dibujos adjuntos. En las figuras, la abcisa muestra la intensidad de fluorescencia por célula cancerosa y la ordenada muestra el número de células cancerosas. Como control, se utilizó un anticuerpo IgM asequible comercialmente (Capel), y se determinaron las reactividades del anticuerpo IgM con las células cancerosas anteriormente identificadas. En las figuras, la línea discontinua y la línea continua muestran las reactividades del anticuerpo 1-3-1 y del control respectivamente. Estas figuras muestran que el anticuerpo 1-3-1 tienen una fuerte capacidad de unión a las células cancerosas.

Experimento 5

55 *Reactividad del Anticuerpo Monoclonal 1-3-1 con Células Derivadas de Tejido Canceroso y Tejido no Canceroso Reciente*

Con el fin de estudiar la especificidad de unión del anticuerpo 1-3-1 a las células cancerosas, se aislaron simultáneamente células normales a partir de tejido reciente perteneciente al mismo órgano del mismo paciente, del cual se obtuvieron las células cancerosas, y se midieron las reactividades del anticuerpo 1-3-1 con las respectivas células. El aislamiento de las células del tejido se llevó a cabo según el método de Tokita descrito en el Experimento 3.

La reactividad con las células obtenidas antes fue determinada mediante FCM de la misma manera que se ha descrito previamente en las células de cáncer vivas. No obstante, las células fueron lavadas con Medio de Cultivo B, suspendidas en suero derivado de voluntarios sanos, cuyo suero contenía el anticuerpo 1-3-1 marcado con fluorescencia (concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$) preparado en el Ejemplo 5 (2), hasta la densidad celular de aproximadamente $1 \times 10^6/200 \mu\text{l}$. La suspensión se dejó reaccionar a 0°C durante 60 minutos y se sometió a centrifugación a 2.000 rpm durante 2 minutos para separar el sobrenadante. Las células restantes se suspendieron en PBS (1 ml) y se lavaron mediante centrifugación. Las células se resuspendieron en PBS (300 μl) conteniendo PI (10 $\mu\text{g/ml}$), y la suspensión se sometió a FCM. Se midió la cantidad de fluorescencia (FITC y PI) unida a células concretas. Los marcadores (5 especies) para determinar la cantidad de fluorescencia (equipo de ensayo cuantitativo previamente descrito) se sometieron a FCM en las mismas condiciones. Se calculó el número medio de FITC unido a una sola célula. En base a la cantidad media y a la razón F/P de anticuerpo marcado calculadas en el Ejemplo 5 (2), se calculó el número medio de anticuerpos unidos a las células cancerosas vivas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Anticuerpo	Colon		Estómago	
	Células Cancerosas	Células No cancerosas	Células Cancerosas	Células No cancerosas
1-3-1	$1,5 \times 10^4$	$0,04 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	$0,05 \times 10^3$
Control	$0,15 \times 10^4$	$0,04 \times 10^4$	$0,2 \times 10^3$	$0,3 \times 10^3$

La reactividad del anticuerpo monoclonal humano 1-3-1 con las células no cancerosas era del mismo nivel que, o menor que, la del anticuerpo derivado de sangre periférica de voluntarios sanos y marcado con fluorescencia de la misma manera que el anticuerpo 1-3-1, si bien el número medio de anticuerpos unidos a las células cancerosas es notablemente superior que el de las células no cancerosas. Además, el número de anticuerpos unidos a las células cancerosas era 10 veces mayor que en el anticuerpo de control tanto del cáncer de estómago como de colon. Estos resultados indican que el anticuerpo 1-3-1 reconoce un antígeno expresado predominantemente en la superficie de la membrana celular de las células cancerosas.

Ejemplo 6

(1) *Determinación de la Subclase de la Cadena Ligera del Anticuerpo Monoclonal 1-3-1*

Con el fin de determinar la subclase de la cadena ligera del anticuerpo 1-3-1, se repitió el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 3 excepto que se utilizó el anticuerpo 1-3-1 obtenido en el Ejemplo 5 (1) en lugar del anticuerpo GAH. La cadena ligera del anticuerpo 1-3-1 reaccionaba con el anticuerpo de la cadena λ anti-humano, que era detectado a través de la aparición de una banda coloreada. Esto revelaba que la cadena ligera era la cadena λ .

(2) *Preparación del Gen que Codifica el Anticuerpo Monoclonal 1-3-1 y Determinación de la Secuencia de Bases*

a. *Preparación del ADNc que codifica el anticuerpo 1-3-1 por medio de PCR*

Según el método detallado antes, se prepararon ARN conteniendo poli(A) a partir del hibridoma productor del anticuerpo 1-3-1 obtenido en el Ejemplo 4 (2) utilizando el método del tiocianato de guanidina-cloruro de litio (DNA 2 329, 1983).

El ARN se preparó de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 3 excepto que el número de células de hibridoma utilizadas fue de 2×10^8 . Los ARN resultantes (aproximadamente 1,8 mg) se disolvieron en una solución (1 ml) comprendiendo Tris-HCL 10 mM, pH 8,0, y EDTA 1 mM. Una alícuota de 230 μl de la solución proporcionaba aproximadamente 20 μg de ARNm conteniendo poli(A) tras la purificación por medio del mRNA PURIFICATION KIT (Pharmacia). Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, el ARNm que contenía poli(A) (4,3 μg) se disolvió en agua (10 μl), y a la solución se añadieron cebador oligo d(T) 12-18 (0,6 μg), 4 dNTP 10 mM (2 μl), transcriptasa inversa (40 U), inhibidor de la ARNasa (30 U), 5 x tampón para transcriptasa inversa (6 μl), y adicionalmente agua para hacer un volumen total de 30 μl . La mezcla se dejó reaccionar a 42°C durante una hora, seguido de

precipitación en etanol para obtener el ADNc.

El ADNc obtenido de ese modo se disolvió en agua (20 μ l). A la solución se añadieron 5 x tampón para desoxinucleótido transferasa terminal (5 μ l), desoxinucleótido transferasa terminal (11 U) y dGTP 10 mM (2,5 μ l) para hacer un volumen final de 25 μ l añadiendo agua (6,5 μ l), y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora para añadir poli d(G) al extremo 3' del ADNc. Una vez completada la reacción, las enzimas fueron inactivadas calentando a 70°C durante 10 minutos.

La PCR se llevó a cabo utilizando el ADNc así obtenido como molde. De ese modo, a la mezcla de reacción anterior (2,5 μ l) se añadieron, como cebador para amplificar el ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada, poli C (14 nucleótidos) que hibrida con la cola dG añadida al extremo 3' del ADNc (25 pmol), un cebador de ADN de hebra sencilla (17 nucleótidos) correspondiente a la secuencia de bases de la región constante de la IgM mostrada en el Listado de Secuencia Núm. 7 (25 pmoles) (Nucleic Acids Research 18 4278, 1990), poli C como cebador para amplificar el ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera (25 pmoles), un cebador de ADN de hebra sencilla (19 nucleótidos) (25 pmoles) correspondiente a la secuencia de bases de la región constante de la cadena λ , mostrada en el Listado de Secuencia Núm. 8 (Nature 294 536, 1981). La mezcla se trató de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 3, lo que proporcionaba un ADNc de doble hebra que tenía los extremos romos.

20 b. Determinación de la secuencia de bases del ADNc

La solución de ADNc obtenida antes se sometió a electroforesis en agarosa al 2%, y se observó una banda a aproximadamente 500 pb. La banda se separó cortándola del gel de agarosa. El ADNc fue insertado en un vector de clonación pUC119 en el sitio SmaI, y la secuencia de bases se determinó mediante el método didesoxi, lo que revelaba que entre la secuencia de bases total del fragmento PCR, las secuencias de bases que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera eran respectivamente las mostradas en los Listados de Secuencias Núms. 9 y 10.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 1-3-1 producido por el hibridoma antes mencionado fueron deducidas a partir de las secuencias de bases determinadas antes y se muestran respectivamente en los Listados de Secuencia Núms. 11 y 12. El fragmento de ADN, cuya la secuencia de bases ha sido determinada, puede ser preparado por medio de un sintetizador de ADN con buena reproducibilidad, y por lo tanto, la adquisición del fragmento de ADN no requiere la repetición del procedimiento anterior.

35 Ejemplo 7

Preparación del Liposoma que Contiene Adriamicina Unido al Anticuerpo GAH

40 a. Preparación del Anticuerpo Tiolado

El anticuerpo anticanceroso GAH (IgG) se disolvió en tampón acetato 0,1 M (pH 4,0), y a esto se añadió pepsina (1/40 moles) (Cooper Biomedical). La mezcla se dejó reaccionar durante la noche para preparar F(ab')₂. La cromatografía sobre una resina de intercambio catiónico (mono S) (Pharmacia) aislaba el F(ab')₂. El disolvente utilizado era un gradiente lineal de tampón acetato 0,1 M (pH 4,0) conteniendo NaCl 0-0,5 M. Al F(ab')₂ aislado en tampón acetato 0,1 M (pH 4,5) conteniendo NaCl 0,15 M se añadió DTT a una razón de 12 μ l de DTT al 10%/1 mg de anticuerpo. La mezcla se dejó estar a la temperatura ambiente durante 80 minutos. Una vez completada la reacción, la mezcla se hizo pasar a través de una columna (PD-10) de filtración en gel equilibrada con PBS para la desalación para obtener el Fab' tiolado.

50

b. Tiolación del poli(etilenglicol)

Se disolvió L-cisteína (48 mg) en tampón borato 0,4 M (10 ml), y a esto se añadió 2,4-bis(poli(etilenglicol)-6-cloro-s-triazina (200 mg) (PEG 2 activado) (Seikagaku Kogyo). La mezcla se dejó reaccionar a la temperatura ambiente durante la noche. Al PEG unido con cisteína resultante se añadió DTT (62 mg), y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 6 horas para obtener una solución que contenía PEG unido con cisteína. La solución se filtró en gel (GH-25, Seikagaku Kogyo) para eliminar las sales, y el disolvente fue sustituido por tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) y NaCl 0,15 M (PBS). La solución se añadió a Sepharose 6B (Pharmacia) tiopropilada equilibrada con PBS, y las sustancias no unidas se separaron lavando con PBS. El PEG unido a cisteína adsorbido al gel fue separado eluyendo con PBS conteniendo DTT 50 mM, que se sometió después a filtración en gel para eliminar el DTT excesivo. Esto dio el PEG tiolado.

60

c. *Maleimidación de dipalmitoilfosfatidiletanolamina*

Se añadieron dipalmitoilfosfatidiletanolamina (127 mg), N-(ϵ -maleimidocaproiloxi)succinimida (EMCS) (80 mg), y trietilamina a una solución de cloroformo/metanol (5:1) (44 μ l), y la mezcla se dejó reaccionar durante 3 horas en gas nitrógeno. Se añadió EMCS adicional (20 mg) y la mezcla se dejó reaccionar a la temperatura ambiente durante 3 horas adicionales. Tras la confirmación de la reacción negativa con ninhidrina de la mezcla de reacción, la mezcla se evaporó hasta sequedad a presión reducida y el residuo se disolvió en una mínima cantidad de cloroformo. La dipalmitoilfosfatidiletanolamina maleimidada obtenida de ese modo se purificó mediante cromatografía utilizando UNISIL (Gasukuro Kogyo) equilibrada con cloroformo, utilizando como eluyente una solución de cloroformo/metanol (10:1).

d. *Preparación del liposoma conteniendo adriamicina que porta el grupo maleimido*

Se añadió una mezcla sólida de lípidos (100 mg) (Nippon Seika), que constaba de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (Col) y dipalmitoilfosfatidiletanolamina maleimidada a una razón de 18:10:0,5 (moles) a tampón citrato 0,3 M (pH 4) (1 ml) y se mezcló. La congelación y descongelación de la mezcla se repitió 5 veces hasta alcanzar la hidratación. Esto produjo liposomas multímeros. El liposoma se cargó en una extrusora (Lipe x Biomembranes) equipada con una membrana de policarbonato (Nucleopore; Microscience) con un tamaño de poro de 200 nm y mantenida a 60°C. Repetidas filtraciones a presión (10 veces) produjeron un liposoma revestido. La solución liposómica fue neutralizada mediante la adición de una solución de NaOH 1 M, y a la solución neutra se añadió un décimo (en peso) de adriamicina (Kyowa Hakko) con respecto a los componentes lipídicos mientras se mantenía a 60°C. Más del 97% de la adriamicina fue englobada positivamente en el liposoma según el declive de pH entre el interior y el exterior del liposoma para dar un liposoma en el que había sido encapsulada la adriamicina que portaba el grupo maleimido.

e. *Unión del liposoma con la adriamicina encapsulada que porta el grupo maleimido al anticuerpo tiolado y modificación con PEG*

Al liposoma con la adriamicina encapsulada obtenido antes (componentes lipídicos: 100 mg) se añadió el anticuerpo Fab' tiolado (5 mg), y la mezcla se dejó reaccionar a 37°C durante 8 horas. A la mezcla de reacción se añadió PEG tiolado (5 μ moles), y la mezcla se dejó reaccionar en PBS a la temperatura ambiente durante 6 horas para obtener el liposoma con la adriamicina encapsulada unido al anticuerpo y modificado con PEG. El último se sometió adicionalmente a filtración en gel utilizando SEPHAROSE C16B (Pharmacia) para eliminar el PEG unido a cisteína que no reaccionaba.

Experimento 6

40 *Confirmación de la Eficacia Farmacéutica del Liposoma con la Adriamicina Encapsulada Unido al Anticuerpo GAH y Modificado con PEG*

Se llevó a cabo un estudio sobre el efecto anticanceroso del anticuerpo GAH de la manera descrita más abajo utilizando la línea celular de cáncer de estómago MKN45 humana que había mostrado reactividad con el anticuerpo GAH y funcionamiento acumulativo en el trasplante a ratones carentes de sistema inmune.

Las células MKN45 (1×10^6) cultivadas fueron trasplantadas subcutáneamente a ratones carentes de sistema inmune. El experimento comenzó cuando el peso del cáncer se hacía de 100 μ g al cabo de diez días del trasplante (Fig. 5). El liposoma con la adriamicina encapsulada unido al anticuerpo GAH y modificado con PEG fue administrado al ratón a través de la vena caudal a una dosis correspondiente a 5 mg/kg de adriamicina el día 0, 3, 7 (mostrado mediante la marca \diamond en la Fig. 5). Como control, se administraron a los ratones (cada uno 6-7 animales) solución salina fisiológica tamponada con fosfato (mostrado mediante la marca \blacklozenge), adriamicina (mostrado mediante la marca \square), y liposoma con adriamicina encapsulada modificado con PEG (mostrado mediante la marca x). La medida en el curso del tiempo del crecimiento del cáncer se llevó a cabo por medio del método de Battle-Columbus donde el peso del presunto cáncer fue determinado según la formulación: (diámetro menor x diámetro mayor)/2, y se comparó con el determinado al comienzo del experimento.

60 En la Fig 5, la abscisa muestra el lapso de tiempo (días) tras el comienzo del experimento, y la marca (\downarrow) indica la administración de la formulación farmacéutica de la invención. La Fig. 5 muestra claramente que la formulación de la invención, el liposoma con la adriamicina encapsulada unido al anticuerpo

ES 2 115 626 T3

GAH, posee un potente efecto anticanceroso. Resulta evidente, por consiguiente, que los anticuerpos monoclonales humanos de la invención permiten la "terapia de búsqueda de objetivo" continua y a largo plazo de tejidos u órganos cancerosos con la ayuda de agentes anticancerosos o toxinas.

5 SEC ID NUM: 1
 LONGITUD DE LA SECUENCIA: 37 pares de bases
 TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico
10 TOPOLOGIA: lineal
 TIPO DE MOLECULA: ADNc
 FUENTE ORIGINAL
15 anticuerpo IgG humano
 G GCC CTT GGT GGA GGC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TCT 37

20 SEC ID NUM: 2
 LONGITUD DE LA SECUENCIA: 21 pares de bases
 TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico
25 TOPOLOGIA: lineal
 TIPO DE MOLECULA: ADNc
 FUENTE ORIGINAL
30 anticuerpo IgG humano
 TGG TGC AGC CAC AGT TCG TTT 21

35 SEC ID NUM: 3
 LONGITUD DE LA SECUENCIA: 357 pares de bases
40 TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico
 TOPOLOGIA: lineal
 TIPO DE MOLECULA: ADNc
45 FUENTE ORIGINAL
 TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

50 CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCA 45
 CAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC 90
 AGT TGT GGT TTC TAC TGG AAC TGG ATC CGC CAG CAC CCA GGG AAG 135
55 GGC CTG GAG TGG ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC 180
 TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTT ACC ATA TCG CTA GAC ACG 225
 TCT AAG AGC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT CTG ACT GCC GCG 270
60 GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG TCT ACC CGA CTA CGG GGG 315
 GCT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA 357

ES 2 115 626 T3

SEC ID NUM: 4

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 342 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

5

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

10

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

```

GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT GTG TCT CTG      45
GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGC CAG AGT GTT TTA      90
15 TAC AAC TCC AAC AAT AAG AAA TAC TTA GCT TGG TAC CAG CAG AAA    135
CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG    180
GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA    225
20 GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA    270
GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG TTC GGC    315
CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA                                342
    
```

25

SEC ID NUM: 5

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 119 aminoácidos

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

30

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

FUENTE ORIGINAL

35

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
40   1           5           10           15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
           20           25           30
45 Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
           35           40           45
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
50           50           55           60
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr
           65           70           75
55 Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ala Ala
           80           85           90
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Arg Leu Arg Gly
60           95           100           105
Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
           110           115           119
    
```


ES 2 115 626 T3

SEC ID NUM: 6

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 114 aminoácidos

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

15 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15
20 Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu
20 25 30
Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45
25 Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60
30 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
80 85 90
35 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly
95 100 105
40 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110 114

SEC ID NUM: 7

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 17 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

anticuerpo IgM humano

C GAG GGG GAA AAG GGT T 17

SEC ID NUM: 8

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 19 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

ES 2 115 626 T3

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

5 anticuerpo Igm humano

G AAG CTC CTC AGA GAA GGG 19

10 SEC ID NUM: 9

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 366 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

15 TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

20 TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

25	CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG	45
	GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC	90
	AGT AGT AGT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG	135
	GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC TAC	180
30	TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG	225
	TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA	270
	GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GGG AGC TAC GGG GGC TAC	315
	TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC	360
35	TCC TCA	366

SEC ID NUM: 10

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 324 pares de bases

40 TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

45 FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

50	TAT GAG CTG ACA CAG CCA CCC TCG GTG TCA GTG TCC CCA GGA CAG	45
	ACG GCC AGG ATC ACC TGC TCT GGA GAT GCA TTG CCA AAG CAA TAT	90
	GCT TAT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC CAG GCC CCT GTG CTG GTG	135
55	ATA TAT AAA GAC AGT GAG AGG CCC TCA GGG ATC CCT GAG CGA TTC	180
	TCT GGC TCC AGC TCA GGG ACA ACA GTC ACG TTG ACC ATC AGT GGA	225
	GTC CAG GCA GAA GAC GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAA TCA GCA GAC	270
	AGC AGT GGT ACT TAT GAG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC	315
60	GTC CTA GGT	324

ES 2 115 626 T3

SEC ID NUM: 11

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 122 aminoácidos

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

5

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

10

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

15	Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
	1				5					10					15
	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser
					20					25					30
20	Ser	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys
					35					40					45
	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr
25					50					55					60
	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr
					65					70					75
30	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala
					80					85					90
	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	Tyr	Gly	Gly	Tyr
35					95					100					105
	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val
					110					115					120
40	Ser	Ser													
															122

SEC ID NUM: 12

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 108 aminoácidos

45

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

50

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

55

60	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
	1				5					10					15
	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Ala	Leu	Pro	Lys	Gln	Tyr
					20					25					30

ES 2 115 626 T3

Ala Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
35 40 45
5 Ile Tyr Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe
50 55 60
10 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75
Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp
80 85 90
15 Ser Ser Gly Thr Tyr Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
95 100 105

Val Leu Gly
108

SEC ID NUM: 13

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 8 aminoácidos

25 TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

30 FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano, para el cual existe un antígeno sobre la superficie de la membrana de las células cancerosas

35 Ile Ser Ser Xaa Xab Xac Tyr Trp
1 5

Xaa : Cys o Ser, Xab : Gly o Ser, Xac: Phe o Tyr

40 SEC ID NUM: 14

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 12 aminoácidos

45 TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

50 FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano, para el cual existe un antígeno sobre la superficie de la membrana de las células cancerosas

55 Ile Gly Xaa Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
1 5 10

Xaa : TYr o Ser,

60 SEC ID NUM: 15

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 4 aminoácidos

ES 2 115 626 T3

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano, para el cual existe un antígeno sobre la superficie de la membrana de las células cancerosas

Gly Xaa Asp Xab
1

Xaa : Ala o Met, Xab : Tyr o Val

SEC ID NUM: 16

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

Ile Ser Ser Cys Gly Phe Tyr Trp Asn
1 5

SEC ID NUM: 17

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 12 aminoácidos

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
1 5 10

SEC ID NUM: 18

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

Ser Thr Arg Leu Arg Gly Ala Asp Tyr
1 5

ES 2 115 626 T3

SEC ID NUM: 19

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 17 aminoácidos

5 TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

10 FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

15 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Asn Ser Asn Asn Lys Lys
1 5 10
Tyr Leu Ala
15

SEC ID NUM: 20

20 LONGITUD DE LA SECUENCIA: 7 aminoácidos

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

25 TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

FUENTE ORIGINAL

30 TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

35 SEC ID NUM: 21

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

40 TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

FUENTE ORIGINAL

45 TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

50 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

SEC ID NUM: 22

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 10 aminoácidos

55 TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

60 FUENTE ORIGINAL

ES 2 115 626 T3

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp
1 5 10

5

SEC ID NUM: 23

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 14 aminoácidos

10

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

15

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro
1 5 10

20

SEC ID NUM: 24

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 12 aminoácidos

25

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

30

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

Gly Ser Tyr Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

35

SEC ID NUM: 25

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

40

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

45

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala Tyr
1 5

50

SEC ID NUM: 26

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 4 aminoácidos

55

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

60

FUENTE ORIGINAL

ES 2 115 626 T3

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

Lys Asp Ser Glu
1

5

SEC ID NUM: 27

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 11 aminoácidos

10

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: proteína

15

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr Glu Val
1 5 10

20

SEC ID NUM: 28

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 24 pares de bases

25

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

30

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano, para el cual existe un antígeno sobre la superficie de la membrana de las células cancerosas

35

ATC AGC AGT WGT RGT TWC TAC TGG 24

W : T o A, R : G o A

40

SEC ID NUM: 29

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 36 pares de bases

45

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

50

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano, para el cual existe un antígeno sobre la superficie de la membrana de las células cancerosas

55

ATT GGG WRY ATC TAT TAY AGT GGG AGC ACC TAC TAC 36

W : T o A, R : A o G, Y : C o T

60

SEC ID NUM: 30

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 12 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

ES 2 115 626 T3

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

5

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano, para el cual existe un antígeno sobre la superficie de la membrana de las células cancerosas

GGK RYK GAC KWC 12

10

K : G o T, R : G o A, Y : C o T, W : A o T

SEC ID NUM: 31

15

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 24 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

20

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

25

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

ATC AGC AGT TGT GGT TTC TAC TGG 24

SEC ID NUM: 32

30

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 36 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

35

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

40

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

ATT GGG TAC ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC TAC TAC 36

SEC ID NUM: 33

45

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 27 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

50

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

55

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

TCT ACC CGA CTA CGG GGG GCT GAC TAC 27

SEC ID NUM: 34

60

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 51 pares de bases

ES 2 115 626 T3

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

5 TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

10 AAG TCC AGC CAG AGT GTT TTA TAC AAC TCC AAC AAT AAG
AAA TAC TTA GCT

51

SEC ID NUM: 35

15 LONGITUD DE LA SECUENCIA: 21 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

20 TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

25 TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC 21

SEC ID NUM: 36

30 LONGITUD DE LA SECUENCIA: 27 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

35 TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano GAH

40 CAG CAG TAT TAT AGT ACT CCG TGG ACG 27

SEC ID NUM: 37

45 LONGITUD DE LA SECUENCIA: 30 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

50 TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

55 ATC AGC AGT AGT AGT TAC TAC TGG GGC TGG 30

SEC ID NUM: 38

60 LONGITUD DE LA SECUENCIA: 42 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

ES 2 115 626 T3

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

ATT GGG AGT ATC TAT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC
CCG

42

SEC ID NUM: 39

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 36 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

GGG AGC TAC GGG GGC TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC

36

SEC ID NUM: 40

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 27 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

GAT GCA TTG CCA AAG CAA TAT GCT TAT

27

SEC ID NUM: 41

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 12 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

AAA GAC AGT GAG

12

SEC ID NUM: 42

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 33 pares de bases

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucléico

TOPOLOGIA: lineal

ES 2 115 626 T3

TIPO DE MOLECULA: ADNc

FUENTE ORIGINAL

5 TIPO CELULAR: Hibridoma productor de anticuerpo humano 1-3-1

CAA TCA GCA GAC AGC AGT GGT ACT TAT GAG GTA 33

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un anticuerpo monoclonal humano que se une específicamente a un antígeno de superficie de la membrana de una célula cancerosa, que comprende obtener dicho anticuerpo de un hibridoma obtenido mediante fusión celular entre linfocitos humanos derivados de un paciente con cáncer y células de mieloma de ratón, teniendo dicho anticuerpo una región variable de la cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos mostrada en los Listados de Secuencia Núms. 13, 14 y 15.
2. El procedimiento de la Reivindicación 1, donde el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de la cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos mostrada en los Listados de Secuencia Núms. 16, 17 y 18, y una región variable de la cadena ligera que contiene una secuencia de aminoácidos mostrada en los Listados de Secuencia Núms. 19, 20 y 21.
3. El procedimiento de la Reivindicación 2, donde el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de la cadena pesada que está representada por la secuencia de aminoácidos mostrada en el Listado de Secuencia Núm. 5, y una región variable de la cadena ligera que está representada por la secuencia de aminoácidos mostrada en el Listado de Secuencia Núm. 6.
4. El procedimiento de la Reivindicación 1, donde el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de la cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos mostrada en los Listados de Secuencia Núms. 22, 23 y 24, y una región variable de la cadena ligera que contiene una secuencia de aminoácidos mostrada en los Listados de Secuencia Núms. 25, 26 y 27.
5. El procedimiento de la Reivindicación 4, donde el anticuerpo monoclonal tiene una región variable de la cadena pesada que está representada por la secuencia de aminoácidos mostrada en el Listado de Secuencia Núm. 11, y una región variable de la cadena ligera que está representada por la secuencia de aminoácidos mostrada en el Listado de Secuencia Núm. 12.
6. Un procedimiento para preparar un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento de la Reivindicación 1, que comprende aislar los ARNm a partir de un hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal.
7. El procedimiento de la Reivindicación 6, donde los ADN parciales que codifican la región variable de la cadena pesada del anticuerpo contienen las secuencias de bases mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 28, 29 y 30.
8. Un procedimiento para preparar un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento de la Reivindicación 2, que comprende aislar los ARNm a partir de un hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal.
9. El procedimiento de la Reivindicación 8, donde los ADN parciales que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo contienen las secuencias de bases mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 31, 32 y 33 y 34, 35 y 36, respectivamente.
10. Un procedimiento para preparar un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento de la Reivindicación 3, que comprende aislar los ARNm a partir de un hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal.
11. El procedimiento de la Reivindicación 10, donde los ADN parciales que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están representados por las secuencias de bases mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 3 y 4, respectivamente.
12. Un procedimiento para preparar un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento de la Reivindicación 4, que comprende aislar los ARNm a partir de un hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal.
13. El procedimiento de la Reivindicación 12, donde los ADN parciales que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo contienen las secuencias de bases mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 37, 38 y 39 y 40, 41 y 42, respectivamente.
14. Un procedimiento para preparar un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento de la Reivindicación 5, que comprende aislar los ARNm a partir de un hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal.

15. El procedimiento de la Reivindicación 14, donde los ADN parciales que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo están representados por las secuencias de bases mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 9 y 10, respectivamente.

5

16. Un procedimiento para preparar un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, que comprende todas las fusiones entre linfocitos humanos derivados de un paciente con cáncer y células de mieloma de ratón.

10

17. Un procedimiento para preparar una formulación anticancerosa, que comprende formular el anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento de una o más de las Reivindicaciones 1 a 5, estando unido dicho anticuerpo a la superficie de un liposoma que contiene un agente anticanceroso o toxina contra las células cancerosas.

15

18. La utilización del anticuerpo monoclonal obtenido mediante el procedimiento de una o más de las Reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

20

19. Un procedimiento para preparar el anticuerpo monoclonal de una o más de las Reivindicaciones 1 a 5 insertando los genes que contienen las secuencias de bases mostradas en los Listados de Secuencia Núms. 3 y 4, ó 9 y 10 en un vector de expresión, transformando una célula huésped apropiada con el vector de expresión, y cultivando el transformante resultante.

25

30

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

Fig. 1

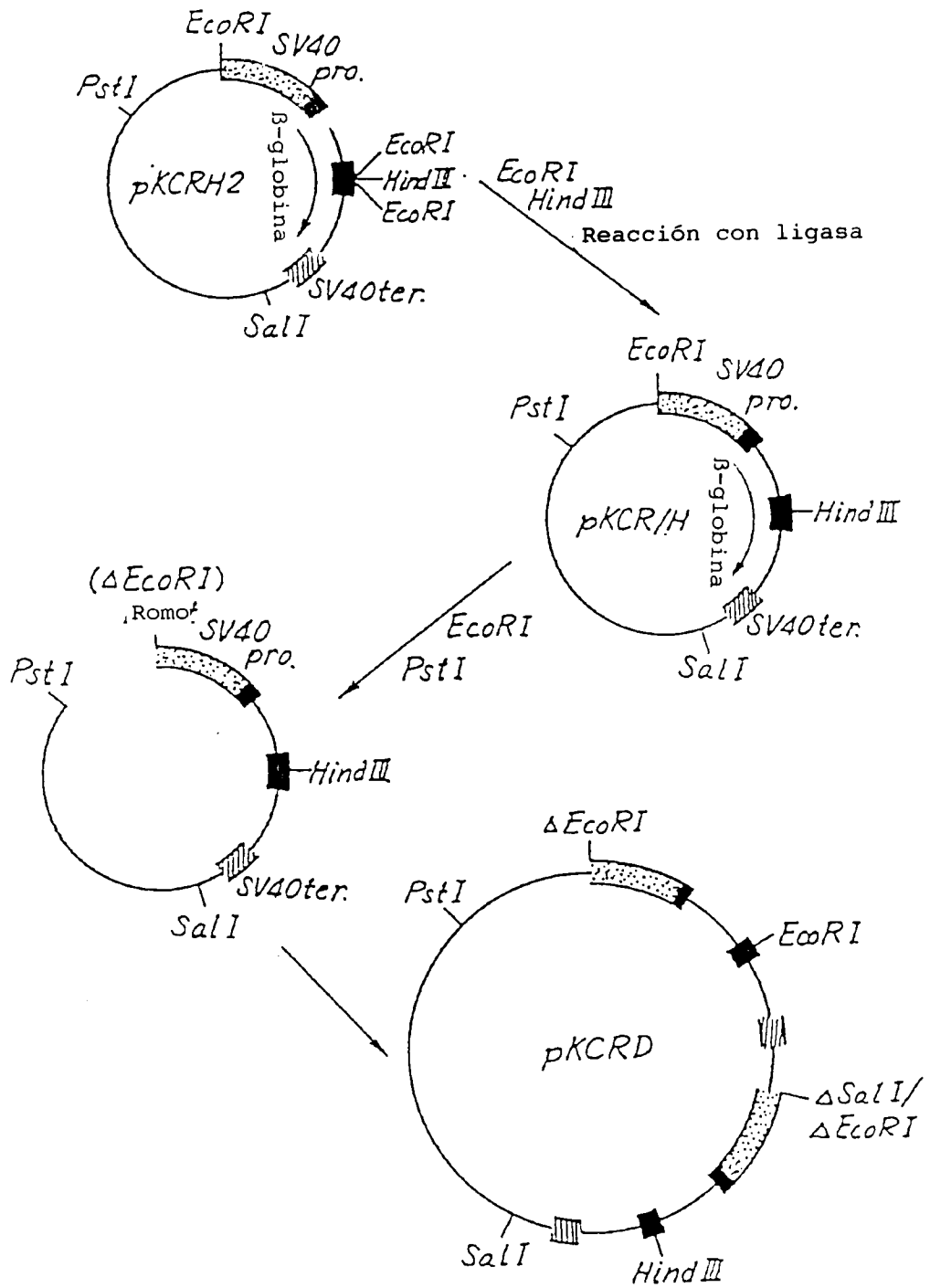


Fig. 2

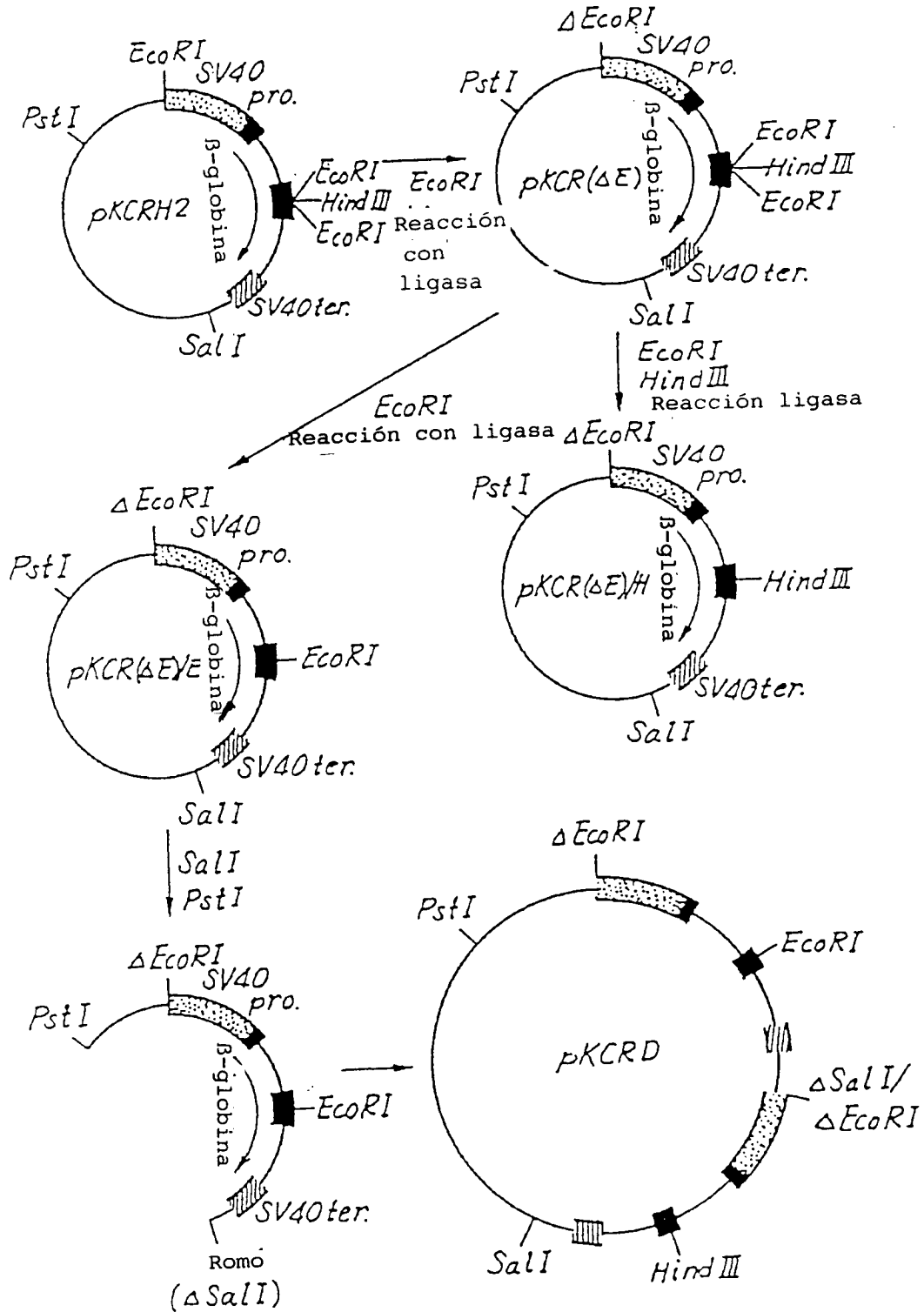


Fig. 3

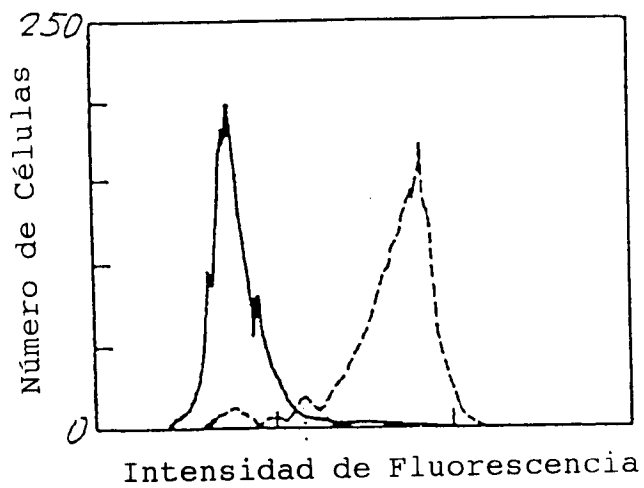


Fig. 4

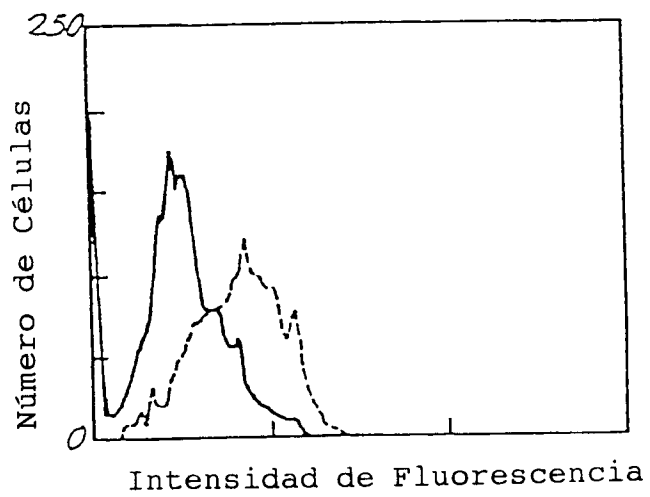


Fig. 5

