



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 797**

51 Int. Cl.:
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04102692 .3**
86 Fecha de presentación : **21.12.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1479696**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal humano que une Ep-CAM y su uso en la terapia del cáncer.**

30 Prioridad: **27.12.1999 EP 99204561**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **Crucell Holland B.V.**
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL

72 Inventor/es: **Logtenberg, Ton**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 282 797 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal humano que une Ep-CAM y su uso en la terapia del cáncer.

5 La invención se refiere al campo de la biotecnología. Más particularmente la invención se refiere al campo de los anticuerpos y usos de los mismos. Uno de tales usos se refiere a los usos médicos de anticuerpos.

10 La exposición a un entorno sumamente diverso y continuamente cambiante requiere un sistema inmunitario dinámico que pueda adaptarse rápidamente para responder adecuadamente a microorganismos potencialmente dañinos. Los organismos superiores han desarrollado mecanismos moleculares especializados para asegurar la puesta en práctica de repertorios clonalmente distribuidos, sumamente diversos de moléculas receptoras de antígenos expresadas por células del sistema inmunitario: moléculas de inmunoglobulina (Ig) en linfocitos B y receptores de células T en linfocitos T. Para linfocitos B, un repertorio primario de (generalmente baja afinidad) receptores de Ig se establece durante la diferenciación de células B en la médula como resultado de una reordenación de segmentos de gen codificados por línea germinal. Tiene lugar un refinamiento adicional de la especificidad y afinidad del receptor de Ig en los órganos linfoides periféricos en los que los linfocitos B estimulados por antígeno activan una maquinaria de hipermutación somática que selecciona específicamente como diana las regiones variables (V) de inmunoglobulina. Durante este proceso, los clones de células B con receptores de Ig mutantes de afinidad superior por el antígeno incitador se estimulan en proliferación clonal y maduración en de células de plasma que segregan anticuerpos (revisado en 1).

20 En los últimos años, se ha usado la tecnología de ADN recombinante para imitar muchos aspectos del proceso que gobierna la generación y selección de repertorios de anticuerpos humanos naturales (revisado en 2, 3). Se ha desarrollado la construcción de grandes repertorios de fragmentos de anticuerpos expresados sobre la superficie de partículas de fago filamentosas y la selección de fagos mediante apelmazamiento en antígenos como un método rápido y versátil para obtener anticuerpos de especificidades deseadas (revisado en 4, 5). Se ha logrado la optimización adicional de la afinidad de anticuerpos de fagos individuales creando repertorios de anticuerpos mutantes que se expresan sobre partículas de bacteriófago y se toman como muestra para detectar mutantes de afinidad superior mediante la selección para unirse al antígeno en condiciones rigurosas (revisado en 6). Se han usado diversos enfoques para crear repertorios de anticuerpos mutados, incluyendo mezcla de cadena (7, 8), PCR propensa a error (9), uso de cepas mutágenas de *E. Coli* (10) o enfoques dirigidos más específicamente a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la molécula de anticuerpo, tales como mutagénesis parsimoniosa y paseo de CDR (11-13).

35 Para seleccionar mutantes de afinidad superior a partir de una biblioteca de fragmentos de anticuerpo mutagenizados, presentados por fago, se han realizado selecciones sobre antígeno inmovilizado purificado o antígeno biotinilado en disolución, seguido de la captura de fago unido sobre perlas magnéticas de estreptavidina (14-16). Se ha demostrado que la selección de fragmentos de un anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv) de afinidad superior específicos para el antígeno c-erb-2 a partir de las bibliotecas de fago de mutantes de esos scFv era dependiente de la disponibilidad del antígeno purificado en la disolución. El antígeno capturado sobre una fase sólida dio como resultado el aislamiento de falsos positivos con mayor avidez más que afinidad debida a la dimerización y oligomerización del scFv sobre le fago. Además, se demostró que era crucial para el aislamiento de scFv de afinidad superior el realizar rondas posteriores de selecciones de fago con concentraciones cuidadosamente controladas y decrecientes de antígeno en la disolución (14). Aunque se han aislado scFv de muy alta afinidad con estos enfoques, no pueden aplicarse fácilmente cuando el antígeno diana es difícil de expresar como una molécula recombinante o tedioso de purificar en cantidades suficientes sin perder su configuración nativa. Ejemplos de estos tipos de moléculas son proteínas con siete sesiones transmembrana, moléculas de membrana insolubles modificadas con lípidos y moléculas proteínicas modificadas tras la traducción que son específicas para tipos de célula particulares o estados de enfermedad. Por tanto un procedimiento de selección de fragmentos de anticuerpo mutante de afinidad superior, sin necesidad del antígeno purificado, representaría una extensión importante de las estrategias de maduración de afinidad para los anticuerpos presentados por fagos.

50 La invención se basa en seleccionar un miembro a partir de una biblioteca de moléculas proteínicas que comprende proporcionar células y/o un equivalente funcional de las mismas, con al menos parte de dicha biblioteca en condiciones que permitan la unión de cualquier miembro a un epítipo en y/o sobre dichas células y/o dichos equivalentes funcionales de las mismas, eliminar moléculas proteínicas no unidas y seleccionar dicho miembro, en el que dicha biblioteca comprende al menos un mutante de molécula proteínica que puede unirse a dicho epítipo. Preferiblemente un mutante comprende una o más mutaciones que afectan a la capacidad de unión del mutante a dicho epítipo de forma positiva o negativa, comparado con la molécula proteínica no mutada. La capacidad puede verse afectada por una afinidad de unión alterada o una constante de disociación alterada o ambas.

60 Un miembro de la biblioteca es una molécula proteínica presente en dicha biblioteca y/o una molécula proteínica seleccionada a partir de dicha biblioteca. Un miembro seleccionado comprende normalmente la capacidad de unirse a dicho epítipo. Una vez seleccionado y caracterizado un miembro también puede generarse de otra manera, por ejemplo, artificialmente, mediante técnicas de biología molecular tales como, pero sin limitarse a, síntesis de péptidos o la expresión de un ácido nucleico que codifica para dicha molécula proteínica. Una molécula proteínica puede ser un péptido, un polipéptido o una proteína. Los péptidos son cadenas de aminoácidos unidas mediante un enlace peptídico. Aunque no está definido precisamente, los péptidos comprenden normalmente entre 2 y 50 aminoácidos. Los polipéptidos son péptidos más largos que pueden contener hasta miles de aminoácidos unidos mediante enlace peptídico. Las palabras polipéptido y proteína se usan a menudo indistintamente para describir cadenas polipeptídicas sencillas y largas. Además, las proteínas pueden consistir en múltiples cadenas polipeptídicas que colectivamente forman la base de

una estructura tridimensional compleja. Un péptido, un polipéptido y/o una proteína pueden comprender modificaciones tales como aquellas generadas por una maquinaria célula de modificación de proteína. Un mutante de una molécula proteínica es una molécula proteínica que comprende uno o más cambios comparada con la molécula proteínica sin mutar. Un cambio puede comprender por ejemplo un intercambio, una delección, una inserción o una adición de uno o más aminoácidos o una combinación de estos cambios. Preferiblemente pero no necesariamente, dicha mutación se genera por un cambio en un ácido nucleico que codifica para dicha molécula proteínica.

Una biblioteca comprende al menos un mutante de una molécula proteínica que puede unirse a un epítipo. Normalmente, una biblioteca comprenderá más de 100 mutantes diferentes de dicha molécula proteínica. Tal biblioteca puede usarse por sí misma o puede combinarse con una o más de otras bibliotecas que comprenden al menos un mutante de otra molécula proteínica que puede unirse a al menos una parte de dicho epítipo. Una ventaja de tal combinación es que aumenta la complejidad de los mutantes aumentando por tanto las probabilidades de encontrar un mutante particularmente favorable. Por supuesto, también puede combinarse una biblioteca con otras bibliotecas o molécula proteínicas. Puede ocasionarse una combinación de este tipo por el deseo de proporcionar una biblioteca que comprende una serie de mutantes de diferentes moléculas proteínicas que pueden unirse a diferentes epítipos presentes sobre una molécula diana dada.

Un epítipo según la invención está normalmente presente en y/o sobre una proteína producida por una célula. Un epítipo es un sitio de unión que puede unirse a dicha molécula proteínica. Un epítipo puede ser (parte de) cualquier tipo de molécula. Normalmente, un epítipo comprende un péptido, un polipéptido, una proteína y/o una modificación tal como se produce mediante maquinaria célula de modificación de proteína.

Las células a las que se proporciona al menos parte de la biblioteca pueden ser células vivas y/o células muertas. Normalmente las células se obtienen de un cultivo. Las células pueden tratarse antes de que se les proporcione al menos parte de la biblioteca. Por ejemplo, con fines de fijación y/o permeabilización. Un equivalente funcional de las células es un extracto celular bruto. En un extracto de este tipo la estructura de las células normalmente está deformada de tal manera que las células individuales pueden esencialmente no reconocerse por medios microscópicos. Un extracto bruto puede haber experimentado varias etapas para eliminar uno o más componentes no deseados. Sin embargo, los extractos que comprenden esencialmente sólo una molécula proteínica que comprende dicho epítipo no se consideran extractos brutos. La línea divisoria entre lo que puede considerarse un extracto bruto y lo que debe considerarse como un extracto purificado es difícil de trazar. Sin embargo, los extractos que comprenden más o menos orgánulos intactos son funcionalmente equivalentes a células. Un equivalente funcional de una célula debe comprender la mayor parte del epítipo en una forma esencialmente similar a una forma que tiene el epítipo cuando está presente en y/o sobre una célula intacta que comprende dicho epítipo.

La eliminación de la parte de la biblioteca que no está unida a las células y/o el equivalente funcional de las mismas, puede lograrse mediante lavado de las células y/o el equivalente funcional de las mismas con una disolución adecuada tal como solución isotónica tamponada. Las células pueden lavarse fácilmente sometiendo a sedimentación a las células y suspendiendo las células en una disolución adecuada. Para la eliminación de esa parte de la biblioteca que no está unida a un equivalente funcional de las células, tal como un extracto de células, resulta ventajoso unir el equivalente funcional de las mismas a un vehículo permitiendo así una manipulación fácil del equivalente funcional. Por supuesto, también pueden unirse las células a un vehículo. Un método preferido para eliminar moléculas proteínicas no unidas es por medio de una o más etapas de lavado. Resulta ventajoso proporcionar una o más etapas de lavado riguroso para eliminar las moléculas proteínicas que están unidas con una afinidad baja eventualmente no deseada. Para células o partes de las mismas tales como orgánulos y/o partículas membranosas no se requiere la unión a un vehículo, aunque todavía puede resultar ventajoso. Un método de la invención comprende normalmente más de 10.000 células o equivalentes funcionales de las mismas. Sin embargo, también pueden usarse cantidades inferiores de células o equivalentes de las mismas. La invención puede realizarse, incluso, usando sólo una célula.

Una molécula proteínica puede ser una molécula proteínica que puede unirse a un epítipo. Ejemplos de una molécula proteínica de este tipo son un anticuerpo (artificial o natural), un fragmento FAB (artificial o natural), un fragmento Fv de cadena sencilla, un receptor de célula T, un ligando, un receptor, un péptido seleccionado preferiblemente a partir de una biblioteca para determinar la capacidad de unión a epítipo específica o una proteína de unión a matriz. Por supuesto, también pueden usarse los equivalentes funcionales de dichas moléculas proteínicas. Tal equivalente funcional comprende la misma actividad de unión a epítipo en tipo pero no necesariamente en cantidad. Un equivalente funcional puede ser una parte, un derivado, y/o un análogo de dicha molécula proteínica. Normalmente un derivado se obtiene mediante una sustitución de aminoácido. Se dice que una molécula proteínica puede unirse a un epítipo cuando se encuentra que las células que comprenden dicho epítipo, con exposición a dicha molécula proteínica seguido por una o más etapas de lavado, pueden retener dicha molécula proteínica hasta un grado significativamente mayor que otras células, esencialmente que no comprenden dicho epítipo.

Dicha molécula proteínica puede comprender un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) y/o un fragmento FAB, o un equivalente funcional del mismo. Un equivalente funcional de dicho fragmento scFv y/o dicho FAB es una parte, un derivado y/o un análogo de dicho scFv y/o dicho FAB que comprende esencialmente la misma actividad de unión que dicho fragmento scFv y/o dicho FAB en tipo pero no necesariamente en cantidad.

Cada uno de dichos mutantes de una molécula proteínica puede estar unido físicamente a un vehículo que comprende ácido nucleico que codifica para dicha molécula proteínica mutante. Esto tiene la ventaja de que cuando dicho

ES 2 282 797 T3

miembro se recupera a partir de dichas células y/o equivalentes funcionales de las mismas, se recupera simultáneamente el ácido nucleico que codifica para dicha molécula proteínica. Dicho ácido nucleico está entonces disponible para multiplicación, análisis, subclonación y/o expresión en una célula.

5 Preferiblemente, dicho vehículo comprende una partícula tipo virus tal como una cápsida de fago o un equivalente funcional de la misma. Se prefiere una partícula tipo virus porque puede condensar ácido nucleico en una forma manejable. También se prefiere en dichas otras células de la misma manera que en células tumorales. Por ejemplo, un ácido nucleico del miembro seleccionado dentro de una célula. Esto resulta particularmente ventajoso cuando el ácido nucleico, una vez introducido en la célula, puede multiplicarse, permitiendo así por ejemplo el aislamiento fácil de cantidades relativamente grandes de dicho ácido nucleico.

Dicho epítipo puede comprender un epítipo asociado a tumor. Un epítipo asociado a tumor es un epítipo esencialmente característico para células tumorales en un organismo. Dicho epítipo puede estar presente en otras células siempre que no esté presente en dichas otras células de la misma manera que en células tumorales. Por ejemplo, un epítipo es un epítipo asociado a tumor cuando está presente sobre la superficie de un célula tumoral y esencialmente no presente sobre la superficie de células no tumorales debido a, por ejemplo, pero sin limitarse, una expresión sustancialmente menor de dicho epítipo en células no tumorales. Dicho epítipo también puede estar presente sobre otras células siempre que dichas células no coexistan normalmente con las células tumorales en el mismo organismo. Un ejemplo típico es un epítipo asociado a tumor presente sobre las células fetales pero esencialmente no presente sobre células adultas normales. Un epítipo asociado a tumor puede determinarse individualmente, es decir, un epítipo asociado a tumor para un individuo puede no ser un epítipo asociado a tumor en otro individuo de la misma especie. Un epítipo asociado a tumor también puede ser parte de una proteína que está presente sobre células normales pero en el que la glucosilación de la proteína en células normales es distinta de la glucosilación de la proteína en células tumorales.

La invención proporciona huMabS de afinidad superior que se unen al antígeno Ep-CAM asociado a tumor, obtenidos construyendo pequeñas bibliotecas de presentación de fago de fragmentos de anticuerpo scFv mutante derivado a partir del scFv UBS-54 anti-Ep-Cam original. Estas bibliotecas se apelmazaron posteriormente sobre células tumorales positivas para Ep-Cam intactas. Las etapas de lavado riguroso durante las selecciones de fago dieron como resultado el aislamiento de scFv C52, que se convirtió en un huMab IgG1 intacto con una mejora de la afinidad de 15 veces y una $KD = 4 \cdot 10^{-10}$ M. La mejora de la afinidad resultó principalmente a partir de una k_{off} (o constante de disociación) inferior. La mezcla de cadenas ligeras y de ADN se empleó para introducir mutaciones en las regiones V del anticuerpo. El aumento de aproximadamente cuatro veces de la afinidad logrado con cada uno de estos enfoques mutagénicos fueron comparables a los resultados logrados por la maduración de afinidad de anticuerpo usando otras técnicas de mutagénesis y de selección de presentación de fago (11, 14, 33). En la presente invención se demuestra que la selección por afinidad puede realizarse sobre células fijadas intactas, descartando la necesidad de purificar o expresar el antígeno diana como una molécula recombinante. Procedimientos de selección previos para el aislamiento de variantes de anticuerpo de afinidad superior a partir de bibliotecas de presentación de fago han usado antígeno soluble purificado o antígeno inmovilizado sobre una fase sólida como dianas para las selecciones de fago. Se ha observado que la selección sobre antígeno unido a fase sólida da como resultado la selección preferente de scFv dímérico sobre monomérico, debido a la avidéz, interfiriendo así con la selección de scFv de afinidad realmente superior (14). La selección en disolución reduce el efecto de la avidéz pero requiere la reducción por etapas y cuidadosa de la concentración de antígeno diana en posteriores rondas de selección (14). Tal como se ha observado para otros scFv, scFv UBS-54 en disolución es una mezcla de dímeros (30%) y monómeros (70%). Se mantuvo esta razón en los mutantes A37, B43, y C52, mostrando que la selección sobre células intactas no dio como resultado una selección predispuesta por los dímeros (datos no mostrados). Se ha realizado la selección de aglutinantes de afinidad superior a partir de una combinación de fagos seleccionados clasificando los scFv mutantes según una k_{off} inferior tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial (6). Aunque se intentó clasificar nuestros scFv según este método, se encontró que los datos experimentales con las preparaciones de scFv periplásmico brutas eran difíciles de evaluar debido a la complejidad de los gráficos de afinidad (RU frente al tiempo), resultantes a partir de las mezclas de monómeros, dímeros y agregados. Por tanto, se decidió buscar clones que dominasen las poblaciones de fago tras tres rondas de selección. Obsérvese que el dominio de los clones de fago en las selecciones no se determina totalmente por afinidad sino que también está influenciado por el nivel de expresión de scFv, la eficacia de plegamiento y el nivel de toxicidad frente a *E. Coli*. Aunque en los análisis la presencia de clones dominantes se correlacionó con scFv de afinidad superior, no se puede excluir que otros clones de afinidad superior pero menos dominantes estuvieran presentes en las combinaciones de fago seleccionadas.

La mezcla de cadenas ligeras dio como resultado la sustitución de la cadena ligera Vk2 original por la cadena ligera Vk3 en el mutante A37. El análisis estructural reveló que la estructura canónica de la cadena ligera Vk3 en A37 consistía en un bucle mucho más corto, creando una superficie de interacción más amplia. Termodinámicamente, es atractivo para las interacciones antígeno-anticuerpo para tener una superficie de interacción grande y próxima porque se excluyen más moléculas de agua (ganancia en la entropía del disolvente) y, lo que es más importante, pueden tener lugar muchas interacciones simultáneas (enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals y dipolo-dipolo) entre epítipo y paratopo (contribuyendo a la entalpía de unión) (23). Estructuralmente, esto da como resultado un sitio de unión de cara amplia del anticuerpo que es complementario a un epítipo igualmente amplio sobre una proteína de interacción grande. Por otro lado, los sitios de unión que consisten en hendiduras profundas que rodean ajustadamente el antígeno están generalmente asociados con ligandos pequeños tales como péptidos y moléculas orgánicas de bajo peso molecular (23).

La mezcla de ADN de la región VL pero no de la región VH dio como resultado el aislamiento de anticuerpos de afinidad superior. La estructura modelada de huMab C52 de alta afinidad indicó que sólo una de las siete mutaciones dentro de la región VL, Asn^{L30A} → Ser, es la que más probablemente afecte directamente la interacción con Ep-CAM. Las otras mutaciones pueden dar como resultado una optimización más sutil de los sitios de unión a anticuerpo mediante enlaces de hidrógeno adicionales e interacciones de compactación mejoradas, tal como se notificó previamente (21), más que una interacción específica mejorada entre uno de los residuos de anticuerpo mutados y el antígeno Ep-Cam. De hecho, la mutación de Ser^{L31} da como resultado un enlace de hidrógeno adicional con Val^{L29} que estabiliza el bucle LCDR1. La principal ganancia en afinidad parece estar provocada por mutaciones localizadas en la periferia del sitio de combinación del antígeno en CDR1, asemejándose a la distribución de mutaciones encontradas en las regiones V mutadas somáticamente *in vivo* (34).

La destrucción *in vivo* mediada por anticuerpo de tumores sólidos es un proceso complejo que implica células efectoras que llevan el receptor de Fc del sistema inmunitario, factores de complemento y acontecimientos de señalización que resultan de la interacción entre el anticuerpo y su diana. La importancia relativa y la contribución a este proceso por las características relacionadas con el anticuerpo tales como afinidad e isótopo están volviéndose el centro de la investigación de anticuerpos, demostrado por los recientes éxitos de los anticuerpos obtenidos mediante ingeniería en el hospital. Se han aprovechado los huMabs anti-Ep-CAM de alta y baja afinidad obtenidos mediante ingeniería para estudiar los dos aspectos de los procesos dependientes de la afinidad del anticuerpo: destrucción de células tumorales y penetración de anticuerpos dentro de agrupaciones de células tumorales imitando micrometástasis.

Se encontró que UBS-54 de baja afinidad penetraba más rápidamente en el centro del esferoide multicelular, dando como resultado una distribución homogénea del huMab. Esta observación apoya otros estudios que muestran que afinidades muy altas de anticuerpos ($>10^9 \text{ M}^{-1}$) conducen al atrapamiento del anticuerpo en el borde del tumor y ralentizan su penetración en el interior del tumor (31, 32, 35, 36).

Sorprendentemente, huMab UBS-54 de afinidad inferior medió una lisis de una célula tumoral específica persistentemente superior con PBMC como fuente efectora comparado con el mutante C52 de afinidad superior. Se obtuvieron los mismos resultados con células diana transfectadas con un constructo de ADNc de Ep-CAM al que le faltaba la cola citoplásmica, lo que sugiere que la señalización por medio de Ep-CAM no desempeña un papel en la destrucción de células tumorales. Aunque muchos FcγR pueden desencadenar ADCC, la FcγRI de alta afinidad parece ser la molécula desencadenante más eficaz (37, 38). Se propone que las diferencias cuantitativas en la activación de células efectoras mediadas por medio de la unión de anticuerpos a FcγRI de alta afinidad pueden afectar a su capacidad para destruir en ADCC. Aunque no se ha elucidado el mecanismo para FcγRI, experimentos recientes con FcεR1, otro miembro de alta afinidad de la familia receptora de reconocimiento inmunitario multicadena, han mostrado que la agregación de este receptor por un exceso de ligando de baja afinidad conduce al secuestro de la cinasa Lyn asociada al receptor (39). Como consecuencia, un menor número de agregados inducidos simultáneamente por un ligando de afinidad superior se vuelve carente de Lyn y por tanto no puede iniciar la cascada de señalización (38). En este modelo, la escasez de una cinasa asociada a receptor evita que las interacciones de baja afinidad activen la cascada de señalización completa (40, 41). Basándose en nuestros datos de destrucción de células tumorales *in vitro*, se plantea la hipótesis de que el desencadenamiento por receptor FcγRI extenso por anticuerpos de muy alta afinidad también puede dar como resultado un secuestro de cinasas asociadas a receptor y consecuentemente dar como resultado una inducción mediada por FcγRI menos eficaz de la cascada de acontecimientos que conducen a la activación de células efectoras.

Los experimentos CDCC mostraron una lisis de célula tumoral específica significativamente superior con huMab C52 comparado con huMab UBS-54, lo que indica una ventaja de anticuerpos de afinidad superior para activar el sistema complemento. Aunque la capacidad mejorada del mutante de afinidad superior para activar el sistema complemento es evidente *in vitro*, varios estudios indican que CDCC puede desempeñar un papel marginal en la destrucción *in vivo* de células tumorales. La mayor parte de células tumorales expresan reguladores que inhiben complemento que protegen las células frente a la lisis por complemento autólogo (42-46). Además, se ha encontrado que los anticuerpos monoclonales específicos de células tumorales son igualmente eficaces para erradicar los tumores en ratones deficientes en factor de complemento C5 como en ratones de control (47). Por tanto, ADCC puede ser el mecanismo inmunológico dominante para destruir células tumorales, lo que sugiere que UBS-54 de afinidad inferior con su capacidad superior para destruir en ADCC puede ser favorable para inmunoterapia pasiva.

55 Ejemplos

Materiales y Métodos

Mutagénesis y maduración por afinidad

El scFv UBS-54, aislado a partir de una biblioteca semisintética de presentación de anticuerpo de fago, está codificado por miembros de las familias de genes de región variable de cadena pesada y ligera VH1 y Vk2 (17, 48). Para mezclas de cadena ligera, se aisló el ARN total a partir de células B de sangre periférica de una combinación de 15 donantes, se convirtió en ADNc mediante cebado de oligo(dT) y se amplificó mediante PCR usando cebadores específicos de la familia de genes Vk2 con sitios de restricción Nco-I y Xho-I: Vk2-NCO-I (5'-GCCTCCACCTC CATGGGATATTGTGACTGACTCAGTCT-3')(SEQ ID NO: 1) y Vk2-XHO-I (5'-GCCTCCACCTCTCGAGCTGCT GACGTAATAAGTTGCAAATC-3')(SEQ ID NO: 2). Se purificaron los productos amplificados, se digirieron con enzimas de restricción adecuadas, se clonaron en vector pPv que contenía la cadena pesada de UBS-54 original, se

ES 2 282 797 T3

transformaron en bacteria XL-1blue y se colocaron en placas sobre placas 2TY que contemplan ampicilina tal como se describe (48). La biblioteca mezclada resultante contenía 2×10^7 clones individuales.

Para selecciones de fago, se lavaron células de carcinoma de colon LS174T en PBS y se fijaron en paraformaldehído al 1% durante 15 min a 4°C. Para la selección de mutantes de afinidad superior se incubaron 10^6 células fijadas y la biblioteca mezclada durante 2 horas a 4°C y se lavaron las células 3 veces en 50 ml de medio enfriado con hielo. El procedimiento de lavado riguroso consistió en la incubación de células fijadas en BSA al 1%/PBS que contenía tween 80 al 0,5% a 37°C. Cada 15 minutos se lavaron las células y se transfirieron a un nuevo tubo eppendorf, se repitió este procedimiento 16 veces. Finalmente, se lavaron las células dos veces en PBS, y se eluyeron los fagos mediante resuspensión del sedimento celular final en 500 μ l de HCl 100 mM durante 5 minutos, seguido por neutralización con 250 μ l de Tris/HCl 1 M pH 7,4. Se propagaron los fagos y se realizaron 2 rondas adicionales de selección usando el mismo procedimiento salvo que el número de ciclos de lavado aumentó en tres cada ronda posterior. Tras la última ronda de selección, se eligieron aleatoriamente 70 colonias y se usaron para análisis de secuencias de nucleótidos.

Se realizó la mezcla del ADN del gen de VH, según un procedimiento descrito en detalle en otra parte (18, 19). En resumen, se amplificó el ADNc de células B de sangre periférica usando cebadores específicos para la familia de genes VH1: NCO-I-VH1:

5'GCCTCCACCTCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG3' (SEQ ID NO: 3)

y XHO-I de VH de pan:

5'GCCTCCACCTCTCGAGTCTCGCACAGTAATACACGGCCG3' (SEQ ID NO: 4).

Tras la purificación, se trataron 2 μ g de producto de PCR con ADNasa I (Sigma, St. Louis, MO) para generar fragmentos de ADN que oscilaban en tamaño entre 50 y 100 pares de bases. Se reagruparon estos fragmentos en un volumen de 100 μ l con dNTP 800 μ M, 0,2 unidades de Taq polimerasa (Supertaq, HT biotechnology Ltd. Cambridge, RU) en el tampón recomendado por el fabricante en ausencia de cebadores. La PCR de reagrupación consistió en 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C y dos min a 72°C. El producto de PCR de reagrupación se usó en una dilución 1/30 en una PCR posterior (20 ciclos) con el cebador NCO-VH1 y adiciones conocidas del cebador XHO-HCDR3-UBS-54: 5' GCCTCCACCTCTCGAGACGGTGACCAGGGTACCTTGGCCCCA [ATA(CAT/AGG/ACC)] [GTG (AAA/CTT/GGC)][AAG (CTA/AGT/ACC)][AAA (CTT/AGG/ACC)][CGG (AAA/CTT/CCC)][GTA (AAT/CGG/GCC)]TCTTGCACAGTAATACACGGCCGTGTC3' (SEQ ID NO: 5). Los nucleótidos entre paréntesis comprenden el 10% de la mezcla. Las adiciones conocidas de oligo cebador de HCDR3 introdujeron una sustitución promedio de 2 de los 6 aminoácidos en el HCDR3 original de UBS-54. Se digirió el producto de PCR con NcoI y XhoI y se clonó en vector pPV que contenía la cadena ligera A37. Esto dio como resultado una biblioteca de 4×10^7 clones. Se incubó la biblioteca con células LS174T fijadas a temperatura ambiente durante 2 horas y se sometieron al procedimiento de lavado riguroso. Tras 3 rondas de selección se analizó la secuencia de nucleótidos de 64 clones.

Para la mezcla de ADN de la cadena ligera, se usaron los siguientes cebadores: NCO Vk2 y Vk2-XHO. Tras el tratamiento con ADNasa I y la PCR de reagrupación, se amplificó el producto reagrupado usando los mismos cebadores, se digirió con SacI y NotI y se clonó en el vector pPV que contenía el gen VH del clon B43. Excepto por el número aumentado de ciclos de lavado, las selecciones de fago con esta biblioteca de 1×10^7 clones fueron idénticas a las descritas anteriormente. Tras 3 rondas de selección, se eligieron 70 clones para el análisis de la secuencia de nucleótidos, dando como resultado la identificación de un clon dominante único (31/70 clones) denominado clon C52.

Construcción y evaluación de huMab intactos

Se eliminaron las regiones VH y VL que codifican para los scFv A37, B43 y C52 y volvieron a clonarse en vectores de expresión para la síntesis de moléculas IgG1/K humanas completas tal como se describe en detalle en otra parte (17, 49). En un procedimiento de clonación de dos etapas, se insertaron en primer lugar las regiones VH y VL que codifican para los scFv en el vector pLEADER para unirse a la secuencia peptídica líder HAVT de cadena α del receptor de célula T y un sitio donador de corte y empalme. En la segunda etapa de clonación, las regiones VH o VL, que contienen sitios donadores de corte y empalme líder y, se subclonaron en los vectores de expresión pNUT-C γ 1 o pNUT-Ck usando sitios de restricción apropiados. Posteriormente se transfectaron de manera estable los constructos en células BHK. En resumen, se mantuvieron las células a 37°C en un incubador humidificado con CO₂ al 5% en medio de Dulbecco modificado por Iscove que contenía FCS al 10%, glutamina 2 mM y gentamicina 10 μ g/ml (medio completo). Se transfectaron células a una densidad del 70-80% de confluencia usando precipitación de ADN de plásmido de fosfato de calcio durante 4 h a 37°C, seguido por un choque con glicerol al 15% durante 1 min. Se inició la selección añadiendo metotrexato 80 μ M (Sigma, St. Louis, MO). Tras 2 semanas, se eligieron colonias de células resistentes y se cultivaron en medio que contenía metotrexato. Se determinó la producción de huMabs en el sobrenadante mediante ELISA cuantitativo. Se determinó la integridad de huMab recombinantes purificados por proteína A mediante SDS/PAGE y mediante tinción con azul brillante de Coomassie de los geles. Se determinó la concentración de huMab purificado mediante espectrofotometría a λ 280 nm. Para la tinción de inmunofluorescencia, se usaron 10 μ l de IgG1 huMab purificado a una concentración de 10 μ g/ml. Se detectaron los huMab mediante IgG de cabra anti-humana conjugada con FITC (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). La línea celular de fibroblasto L929 y las células L929 transfectadas con ADNc de Ep-CAM (LME-6) fueron un generoso regalo del Dr. S. Litvinov (Universidad de Leiden, Países Bajos) (50).

Mediciones de afinidad

En células de flujo BIAcore separadas, se acoplaron aproximadamente 160, 1565 y 4154 unidades de resonancia de Ep-CAM recombinante purificado producido en células de insectos (generosamente proporcionadas por el Dr. D. Herlyn, Wistar institute, Filadelfia, PA) (25 $\mu\text{g/ml}$) en tampón acetato 10 mM (pH 4,0) con un chip detector de CM5 usando química combinatoria NHS/EDC. Se midieron la asociación y la disociación en condiciones de flujo continuo de 30 ml/min usando un intervalo de concentración de desde 100 hasta 1 nM.

Análisis estructural

Tras el alineamiento secuencial y estructural inicial usando la clasificación automática descrita por Martin y Thornton (51), se eligió estructura 1GC1 (52), depositada en el Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank) (53), como estructura principal para la cadena pesada de todos los modelos. Para crear una estructura principal para los CDR H3 no canónicos, se realizó una búsqueda de bucle con el programa SYBYL v.6.5 (Tripos Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.) entre residuos de Gly⁹⁴ y Phe^{100y} de 1GC1. Estas posiciones, desviándose relativamente poco en los ángulos de torsión (26), preceden a una parte más variable del CDR H3. Además, las regiones 92-94 y 100y-104 muestran una alta similitud de secuencia con 1GC1. Se usó la estructura 1NQB (54) con el bucle L3 CDR de 1JRH (55) como estructura principal para la cadena ligera del anticuerpo UBS-54. Se usó la estructura 1FIG (56) como estructura principal para las cadenas ligeras para los modelos A37 y C52. Se realizó la modelización real con el módulo BLDPIR de WHAT IF v. 19970813-1517 (57). Se comprobó la calidad con el PROCHECK v. 3.3 (58) y el módulo WHATCHECK de WHAT IF. Pueden encontrarse las coordenadas atómicas de los modelos en <http://www.wcmc.pharm.uu.nl/moret/pub/>. Se creó una base de conocimiento mediante el análisis de los siguientes complejos antígeno-anticuerpo, seleccionados del Banco de Datos de Proteínas: 1BAF, 1CBV, 2GCR, 1CLZ, 1DBB, 1EAP, 1FIG, 1FLR, 1GAF, 1HYX, 1IBG, 1IGJ, 1IND, 1KEL, 1KNO, 2MCP, 1MFA, 1MRD, 1MPA (clase hapteno), 1ACY, 1TET, 1FPT, 1FRG, 1GGI, 2IGF (clase péptido), 1AFV, 1DVF, 1FBI, 1VFB, 3HFL, 3HFM, 1LAI, 1IKF, 1JEL, 1JHL, 1MLC, 1NCD, 1NMB, 10SP (clase proteína). Los programas usados para el análisis son: HBPLUS (59) "AS INTEGRATED IN LIGPLOT" v.3.0 (60), NACCESS v.2.1.1 (Hubbard, S.J., y Thornton, J.M. 1993. "NACCESS", Programa informático, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, University College London), DISCOVER v.97.0 (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA, EE.UU.) y SYBYL. El análisis de la secuencia de proteínas se llevó a cabo con el programa BLAST v.2.0 (61).

Citotoxicidad celular dependiente de complemento y anticuerpo

Se evaluó la actividad citolítica de células polimorfonucleares (PMN) y células mononucleares (PBMC) de sangre periférica humana en un ensayo convencional de liberación de ⁵¹Cr (62). En resumen, se marcaron las células tumorales diana se marcaron con 150 μCi de ⁵¹Cr (Amersham, Buckinghamshire, RU) durante 2 h a 37°C. Tras lavado extenso, se colocaron en placas las células diana en placas de microtitulación con fondo en U a una concentración de 5×10^3 células/pocillo. Se añadieron PMN y PBMC humanas aisladas a cada pocillo a una razón efector:diana de 80:1. Se incubaron las células a 37°C en presencia de varias concentraciones de anticuerpos purificados en un volumen final de 200 μl . Para los ensayos ADCC de sangre completa, se añadieron 50 μl /pocillo de sangre periférica heparinizada como fuente de células efectoras. Se realizó la lisis mediada por complemento con 50 μl de suero. Tras 4 h, se determinó la liberación de ⁵¹Cr por triplicado. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad celular según la fórmula: % de lisis específica = $([\text{cpm experimental} - \text{cpm basal}] / [\text{cpm máxima} - \text{cpm basal}]) \times 100\%$, determinándose la máxima liberación de ⁵¹Cr tras lisar las células diana con Zapoglobina al 10% (Coulter, Pittsburgh, PA), y midiéndose la liberación basal tras incubar células diana con medio solo. Se recogió la sangre periférica heparinizada de voluntarios sanos. Se aislaron PMN y PBMC mediante centrifugación a gradiente discontinuo de Ficoll-Histopaque, tal como se describió previamente (63). Se eliminaron los eritrocitos contaminantes mediante choque hipotónico con NaCl al 0,2%. Las células efectoras eran puras en más de un 95%, tal como se determina mediante preparaciones de citospina y viables en más de un 95% tal como se evalúan mediante exclusión con azul trypan. Para los experimentos ADCC y CDCC, se usaron como células diana células tumorales LS174T y células HCA transfectadas con Ep-CAM humano (HCE) o con Ep-CAM humano con cola citoplásmica delecionada (HCM), ambas bajo control transcripcional de un promotor de metalotionina (64). Las células HCE y HCM fueron generosamente proporcionadas por el Dr. S. Litvinov (Dept. de Patología, Universidad de Leiden, Países Bajos).

Penetración de anticuerpos en esferoides multicelulares

Se marcaron los anticuerpos purificados UBS-54 y C52 mutante con FITC según procedimientos convencionales. Se incubaron varias veces esferoides multicelulares que se producen de manera natural de línea celular del carcinoma GLC-8 Ep-CAM + durante diversos tiempos con huMab marcados con FITC y se analizaron usando un CLSM MRC-1000 de BioRad (BioRad, Hercules, CA). Se registraron las imágenes confocales tras 10-15 minutos de incubación en el centro del esferoide multicelular tal como se describe (65).

*Resultados**Generación y selección de bibliotecas mutantes*

Recientemente, se ha descrito el aislamiento de scFv dirigidos contra la molécula de Ep-CAM asociada a tumor y su conversión en un anticuerpo IgG1 humano funcional, intacto con una afinidad de 5 nM (19). Se sustituyó la cadena

ligera Vk2 de la línea germinal de este anticuerpo por las cadenas ligeras Vk obtenidas mediante amplificación por PCR de ADNc extraído a partir de linfocitos de sangre combinada de 15 individuos sanos. Se generó una biblioteca de representación de fago de 2×10^7 clones y posteriormente se colocó en una bandeja de células de carcinoma de colon LS174T Ep-Cam + fijadas en paraformaldehído. Obsérvese que 24 clones elegidos aleatoriamente de la biblioteca
 5 no seleccionada se unieron todos a la línea celular LME-6 transfectada por Ep-CAM pero no a la línea celular L929 original en análisis de citometría de flujo, mostrando el papel dominante del gen de VH para determinar la especificidad de Ep-CAM. Se incubaron las células con fagos unidos a 37°C y se lavaron cada 15 minutos con PBS/tween (0,5%) durante 16 ciclos. En experimentos preliminares, se determinó que los fagos que expresan el scFv de UBS-54 no podían detectarse por citometría de flujo en células de carcinoma de colon LS174 tras estos procedimientos de lavado
 10 riguroso. Pudieron recuperarse aproximadamente 10^7 fagos tras la primera, segunda y tercera rondas de selección, mientras que el número de ciclos de lavado aumentaba en 3 cada ronda posterior. El análisis de la secuencia de nucleótidos de clones elegidos aleatoriamente de la tercera ronda de selección reveló una secuencia de Vk idéntica en aproximadamente el 50% de los clones. Este clon se denominó A37.

Estudios cristalográficos y de injerto de CDR han mostrado de manera convincente que ambas mutaciones en las regiones de CDR y framework de las regiones V pueden contribuir a la mejora de la afinidad de los anticuerpos (20, 21). Por tanto, se ha seleccionado la mezcla de ADN como segunda estrategia de mutagénesis porque da como resultado la introducción de mutaciones en ambas regiones de CDR y framework. La mezcla de ADN introduce mutaciones puntuales e intercambio de extensiones de ADN entre genes homólogos, imitando así la evolución natural de la proteína (18, 19). Además, esta estrategia de mutación, introduce potencialmente bloques de CDR que ya han sido seleccionados para aminoácidos favorables tales como Tyr, Trp, Ser, y Asp. Los aminoácidos Tyr, Trp, Ser, y Asp son favorables para la unión a antígeno porque tienen una bajo grado conformacional de libertad (menos entropía que perder) y participan en una variedad de interacciones moleculares, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, y apilamiento p aromático (Tyr y Trp) (22, 23). Se mezcló el gen de VH1 que codifica para scFv UBS-54 con segmentos de gen de VH1 amplificados de la combinación donantes sanos. Se usaron fragmentos de 50-100 pares de bases obtenidos tras la digestión con ADNasa I en una PCR de reagrupación, y se amplificaron posteriormente con un cebador en 5' específico de VH1 y un cebador CDR3 de adición conocida. El cebador de oligonucleótido de adición conocida se diseñó para introducir una baja tasa de mutaciones en la región CDR3 de los segmentos del gen de VH1. Se construyó una pequeña biblioteca de 4×10^7 clones mutagenizados de
 20 VH1 ligando material amplificado por PCR en el constructo que contiene la cadena ligera A37. Se seleccionó posteriormente esta biblioteca sobre células fijadas intactas. El análisis de secuencia de 24 clones elegidos aleatoriamente de la biblioteca mezclada de ADN sin seleccionar demostró un promedio de aproximadamente 18 mutaciones en el gen de VH entero con un promedio de 2,6 mutaciones en la región CDR3. Este número de mutaciones disminuyó hasta aproximadamente 4 mutaciones en cada gen de VH tras tres rondas de selección. Obsérvese que todos los clones analizados tras tres rondas de selección contenían la región CDR3 del UBS-54 original. Como no pudo detectarse ningún clon único dominante tras tres rondas de selección para unirse a las células de carcinoma LST174, se eligió aleatoriamente el clon B43 para un análisis adicional. Esta elección se basó en la observación de que contenía un número de mutaciones frecuentemente observadas en otros clones de esta colección. Posteriormente se realizó la mezcla de ADN con la cadena ligera usando la colección de segmentos de gen de Vk usados para la construcción de la biblioteca mezclada de cadena ligera. La biblioteca resultante comprendía 1×10^7 clones y se seleccionó para unirse a las células intactas en condiciones rigurosas. Tras tres rondas de selección, se realizó el análisis de secuencia y reveló un único clon dominante (31 secuencias de 70), denominado clon C52.

Reconstrucción de huMab intactos

Se clonaron de nuevo las regiones V de scFv A37, B43 y C52 mutantes en vectores de expresión eucariotas para la producción de huMab de IgG1 en células BHK (17). Se purificó la inmunoglobulina a partir del sobrenadante de líneas celulares transfectadas de manera estable usando cromatografía de afinidad de proteína A tal como se describe (17). Aunque pudieron aislarse huMabs intactos y funcionales a partir del sobrenadante de clon B43 (datos no mostrados),
 50 no reveló mejora significativa de la afinidad para el Ep-CAM recombinante en análisis BiaCore (véase el siguiente párrafo). Por tanto se centró la atención en UBS-54 original y los mutantes A37 y C52. Se confirmó la integridad de huMab de IgG1/K A37 y C52 mediante tinción con Coomassie de geles SDS/PAGE usados en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes (figura 1). Los huMabs A37 y C52 purificados, conservaron su especificidad tal como se determina mediante unión a la línea celular LME-6 transfectada con Ep-CAM pero no la línea celular original L929 no transfectada (figura 1).

Análisis Biacore

Se determinaron las tasas cinéticas de asociación y disociación del huMab UBS-54 original y de los huMab A37 y C52 mutantes mediante resonancia de plasmón superficial (tabla 1). Se usaron el huMab UBS-54 original y el anticuerpo murino anti-Ep-CAM 323/A3 como controles, revelando una KD promedio de 6 nM y 0,5 nM respectivamente. El huMab A37 con la cadena ligera de Vk mezclada demostró una afinidad de 1,6 nM (aumento de ~4 veces). Se mejoró la afinidad de unión del huMab C52 que contenía la cadena ligera de Vk mezclada de ADN 15 veces si se compara con el huMab UBS-54 original, dando un huMab con una $KD = 4 \times 10^{-10}$ nM. La mejora fue esencialmente el resultado de una constante de disociación inferior.

Análisis estructural

El análisis de secuencia muestra que la cadena ligera seleccionada en A37 mutante representa sólo el 54% de homología de secuencia con la cadena ligera original en UBS-54 y tiene una secuencia CDR1 más corta (figura 2). La cadena ligera de A37 es un miembro de la familia de genes de Vk3 con el mayor grado de homología con el segmento génico de la línea germinal DPK22/A27 (24). Aunque el cebador de Vk se hibrida preferentemente con los genes de Vk2, se observó que los genes de Vk3 también estaban presentes en la biblioteca mezclada. El bucle de CDR1 más corto en C52 parece que sobresale en menor grado en el sitio de unión a antígeno, creando una superficie de contacto plana, que es favorablemente energética en anticuerpos anti-proteína (23; figura 3).

La afinidad del mutante C52 maduro difiere de la del A37 por tres cambios de aminoácidos en la cadena pesada (las mutaciones de B43 de VH, introducidas por mezcla de ADN de VH) y por ocho mutaciones adicionales en la cadena ligera (las mutaciones de C52 de VL, introducidas por mezcla de ADN de VL) (figura 2 y figura 3). Las mutaciones Ser^{H16} → Ala, Arg^{H19} → Lys, Arg^{L40} → Pro, Ser^{L65} → Thr y Glu^{L105} → Asp se localizan dentro de la región framework, lejos del sitio de combinación y es probable que no estén implicadas en la estabilización de la conformación de los bucles CDR. La mutación Ile^{H52} → Val en H2 de CDR puede dar como resultado la eliminación de la interacción estérica de repulsión del átomo de Cd de Ile^{H52}. Sin embargo, dado que el B43 mutante con las mismas mutaciones no muestra aumento significativo en la afinidad de unión a antígeno (datos no mostrados), el efecto global de esta mutación parece ser pequeño. El residuo L50 (mutación Ala^{L50} → Gly) está frecuentemente implicado en el contacto de antígeno según la base de conocimiento. Un cambio en la conformación de la estructura principal de L2 de CDR, debido a la libertad conformacional superior de Gly no es probable, dado que el L2 de CDR ha conservado la estructura canónica (25). Supuestamente, debido a la distancia relativamente grande entre la parte superior de L2 de CDR y la superficie del anticuerpo, que incluye el sitio de unión a antígeno, las interacciones de alta energía parecen estar reservadas para aminoácidos con grandes cadenas laterales.

Cuatro mutaciones están localizadas en la L1 de CDR, Thr^{L28} → Ser, Ile^{L29} → Val, Asn^{L30A} → Ser y Asn^{L31} → Ser (figura 2 y figura 3). La base de conocimiento revela que las posiciones de anticuerpo L28, L29 y L31 interaccionan en casos muy poco frecuentes en complejos de proteína-anticuerpo, al contrario que la posición L30A. En el caso de la posición L28 (mutación Thr^{L28} → Ser), esta se debe probablemente a su localización periférica.

La cadena lateral Ile^{L29} de A37 se incrusta dentro de la L1 de CDR, estabilizando el bucle mediante interacciones de compactación, que imita el Val^{L29} de C52. La cadena lateral Asn^{L31} de A37 parece estar girada hacia fuera del sitio de unión. La mutación Ser^{L31} de C52 permite un enlace de hidrógeno adicional entre sus grupos hidroxilo y el grupo carbonilo de la cadena principal de Val^{L29}, estabilizando adicionalmente el bucle de L1 de CDR. Es muy probable que la mutación de punto caliente (“Hotspot”) Asn^{L30A} → Ser afecte a la interacción con Ep-CAM directamente.

Análisis funcional

La disponibilidad de dos huMab anti-tumorales con la misma especificidad de epítipo pero distintas afinidades permitió evaluar de manera precisa la influencia de la afinidad sobre la capacidad de destrucción de células tumorales *in vitro* en ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y complemento (ADCC y CDCC respectivamente). ADCC con células diana tumorales LS174T y PBMC como fuente de células efectoras dio consistentemente como resultado una lisis de células tumorales un 10% inferior con el huMab C52 de alta afinidad comparado con el huMab UBS54 original (figura 4). La lisis de células tumorales persistentemente inferior mediada por huMab C52 se produce a concentraciones de anticuerpo saturadas, indicadas mediante la forma de meseta en la curva (figura 4). Basándose en estudios en animales y la actuación mejorada de anticuerpos monoclonales de humano/ratón quiméricos en pacientes, se considera que ADCC es un mecanismo inmunológico importante en la destrucción de células tumorales (26, 28). Un efecto inhibitorio directo de los anticuerpos terapéuticos sobre el crecimiento de células tumorales o la inducción de apoptosis de células tumorales, mediado por la unión de anticuerpos a sus receptores diana, también puede contribuir a la eficacia clínica (29, 30). Para evaluar si la lisis de células tumorales menos eficaz mediada por C52 era independiente de la transducción de señales por medio de Ep-Cam, se realizó ADCC con líneas celulares HMA transfectadas con ADNc de Ep-CAM de longitud completa o con un ADNc de Ep-CAM mutante que carece de cola citoplásmica. Con ambos transfectantes, se observó de manera reproducible la misma destrucción de células tumorales menos eficaz del huMab mutante C52, lo que sugiere que la diferencia observada en la capacidad de destrucción entre UBS54 y C52 no está influenciada por variaciones en la transducción de señales por medio de Ep-CAM (datos no mostrados).

Los mismos experimentos realizados con sangre completa en lugar de PBMC purificada como fuente de células efectoras demostraron una lisis de células tumorales significativamente más eficaz con el huMab C52 mutante de alta afinidad (figura 4). Se planteó la hipótesis de que el rendimiento mejorado de huMab C52 de alta afinidad estaba provocado por una CDCC más eficaz. De hecho, huMab C52 mediaba más eficazmente la destrucción de células tumorales en ausencia de células efectoras y con suero como fuente de complemento (figura 4). Aparentemente, la tasa de disociación inferior de huMab C52 mutante da como resultado una reticulación más eficaz del fragmento de complemento C1q.

Influencia de la afinidad del anticuerpo sobre la penetración en esferoides multicelulares de células tumorales

La percolación profunda y la distribución uniforme a través del tumor de anticuerpos monoclonales en inmunoterapia de tumores sólidos se considera que es importante para un efecto terapéutico óptimo. Estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que el transporte de anticuerpos a través del intersticio tumoral se retrasa por su unión específica al antígeno tumoral. Esta denominada barrera de sitio de unión es una función de la afinidad de unión, concentración de antígeno y los coeficientes de transporte de anticuerpo (31, 32). Para determinar el efecto relativo de la barrera de sitio de unión de los huMab anti-tumorales de alta y baja afinidad, se empleó un sistema de modelo esferoide multicelular *in vitro*. Se incubó la línea celular de carcinoma de pulmón de célula pequeña, Glc-8, que expresa altos niveles de Ep-CAM y crece en esferoides multicelulares de aproximadamente 100 células, con 10 mg de C52 o UBS54 conjugado con FITC. La microscopía de barrido láser confocal de los esferoides tras 10-15 minutos de incubación reveló una barrera de sitio de unión con huMab de afinidad superior. En este punto de tiempo se observó la unión uniforme de huMab UBS-54 con células en los esferoides, mientras que la unión del mutante C52 de afinidad superior quedaba casi restringida a la capa celular externa (figura 5). Tras una hora de incubación, se observó la unión uniforme a todas las células en los esferoides para ambos anticuerpos (datos no mostrados).

Breve descripción de las figuras

Figura 1: análisis SDS/PAGE huMab purificados en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B) (UBS-54, bandas 1 y 4; A37, bandas 2 y 5; C52, bandas 3 y 6). PM: marcadores de peso molecular en kilodaltones. Panel C: tinción de línea celular L929 original negativa para Ep-CAM (línea delgada) y células positivas para Ep-CAM transfectadas de manera estable (línea gruesa) con huMab UBS-54, huMab A37, y huMab C52.

Figura 2: Comparación de secuencias del UBS-54 original y los mutantes A37 y C52 de afinidad superior. Obsérvese que la secuencia CDR1 más corta en la cadena ligera de Vk3 mezclada. Numeración según Chothia (25).

Figura 3: La modelización de UBS-54 original (A) y de las regiones V de anticuerpo mutagenizado de C52 (B) muestra la estructura canónica más corta de LCDR1 (flecha). El aumento (C) muestra las posiciones de los residuos mutados en LCDR1 (Thr^{L28} → Ser, Ile^{L29} → Val, Asn^{L30A} → Ser y Asn^{L31} → Ser). Lo más probable es que la posición Ser^{L30} afecte a la interacción con Ep-CAM. Un enlace de hidrógeno entre Ser^{L31} y Val^{L29} da como resultado la estabilización del bucle LCDR1.

Figura 4: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad celular dependiente de complemento (CDCC) usando huMab UBS-54 (■) y huMab C52 (▣). Los experimentos mostrados son representativos de al menos 6 experimentos realizados con células efectoras de distintos donantes.

Figura 5: Imágenes de microscopio láser de barrido confocal registradas en el centro los esferoides multicelulares Glc-8 con huMab UBS54 marcado (A) y huMab C52 con FITC marcado (B).

TABLA 1

Afinidades y cinética de unión de huMab UBS-54, A37 y C52. El error estándar de la media se indica entre paréntesis

IgG1	Ka (1/MS) * 10 ⁵	Kd (1/s) * 10 ⁻⁴	KD (nM)
UBS-54	1,0 (0,3)	6,0 (0,7)	6,0
A37	2,5 (0,3)	4,1 (0,4)	1,6
C52	2,7 (0,6)	1,1 (0,8)	0,4

Bibliografía

- 1 Berek, C., & Milstein, C. 1987. Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol. Rev.* 96: 23.
- 2 Winter, G. & Milstein, C. 1991. Man-made antibodies. *Nature.* 349: 293.
- 3 Vaughan, T.J., Osbourn, J.K., & Tempest, P.R. 1998. Human antibodies by design. *Nat. Biotechnol.* 16,535.
- 4 Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., & Hoogenboom, H.R. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433.
- 5 Burton, D.R., & Barbas, C.F. 1994. Human antibodies from combinatorial libraries. *Adv. Immunol.* 57: 191.

- 6 **Hoogenboom, H.R.** 1994. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends in Biotechnol.* 15: 62.
- 7 **Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Clackson, T., Bye, J.M., & Winter, G.** 1992. Bypassing immunisation: high affinity human antibodies by chain shuffling. *Bio/Technology.* 10: 779.
- 8 **Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., & Winter, G.** 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature.* 352:624.
- 9 **Hawkins, R.E., Mussel, S.J., & Winter, G.** 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity: mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* 226: 889.
- 10 **Low, N.M., Holliger, P.H., & Winter, G.** 1996. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260,359.
- 11 **Barbas, C.F., Hu, D., Dunlop, N., Sawyer, L., Cababa, D., Hendry, R.M., Nara, P.L., & Burton, D.R.** 1994. *In vitro* evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3809.
- 12 **Yang, W.-P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R., & Barbas, C.F.** 1995. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* 254: 392.
- 13 **Balint, R.F., & Larrick, J.W.** 1993. Antibody engineering by parsimonious mutagenesis. *Gene.* 137: 109.
- 14 **Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G.P., Malmqvist, M., Weiner, L.M., & Marks, J.D.** 1996. Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J. Mol. Biol.* 255: 28.
- 15 **Chowdhury PS, Pastan I.** 1999. Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 17: 568.
- 16 **Neri D, Carnemolla B, Nissim A, Leprini A, Querze G, Balza E, Pini A, Tarli L, Halin C, Neri P, Zardi L, Winter G.** 1997. Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nat Biotechnol* 12: 1271.
- 17 **Huls, G.A., et al.** 1999. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol.* 17: 276.
- 18 **Stemmer, W.P.C.** 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10747.
- 19 **Stemmer, W.P.C.** 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature.* 370: 389.
- 20 **Foote, J., & Winter, G.** 1992. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* 224: 487.
- 21 **Wedemayer, G.J., Patten, P.A., Wang, L.H., Schultz, P.G., & Stevens, R.C.** 1997. Structural insights into the evolution of an antibody combining site. *Science* 276: 1665.
- 22 **Mian, I.S., Bradwell, A.R., & Olson, A.J.** 1991. Structure, function and properties of antibody binding sites. *J. Mol. Biol.* 217: 133.
- 23 **Davies, D.R., Padlan, E.A., & Sheriff, S.** 1990. Antigen-antibody interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 439.
- 24 www.mrc-cpe.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html Tomlinson, I.M., Williams, S.C., Corbett, S.J., Cox, J.P.L., & Winter, G. V 1997. Base: the database of human antibody genes. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK.
- 25 **Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., & Chothia, C.** 1997. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 273:927.
- 26 **Surfus, J.E., Hank, J.A., Oosterwijk, E., Welt, S., Lindstrom, M.J., Albertini, M.R., Schiller, H.J.H., & Sontel, P.M.** 1996. Anti-renal-cell carcinoma chimeric antibody G250 facilitates antibody-dependent cellular cytotoxicity with *in vitro* and *in vivo* interleukin-2-activated effectors. *J. Immunother.* 3: 184.
- 27 **Denkers, E.Y., Badger, C.C., Ledbetter, J.A., & Bernstein, I.D.** 1985. Influence of antibody isotype on passive serotherapy of lymphoma. *J. Immunol.* 135: 2183.

- 28 **Kaminski, M.S., Kitamura, K., Maloney, D.G., Campbell, M.J., & Levy, R.** 1986. Importance of antibody isotype in monoclonal anti-idiotype therapy of a murine B cell lymphoma: a study of hybridoma class switch variants. *J. Immunol.* 136: 1123.
- 5 29 **Ghetie, M.A., Podar, E.M., Ilgen, A., Gordon, B.E., Uhr, J.W., & Vitetta, E.S.** 1997. Homodimerization of tumorreactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 7509.
- 10 30 **Tutt, A.L., et al.** 1998. Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma: signalling activity on tumor cells appears more important than recruitment of effectors. *J. Immunol.* 161: 3176.
- 31 **Osdol, W., Fujimori, K., & Weinstein, J.N.** 1991. An analysis of monoclonal antibody distribution in microscopic tumour nodules: Consequences of a "Binding Site Barrier". *Cancer Res.* 51: 4778.
- 15 32 **Langmuir, V.K., Mendonca, H.L., & Woo, D.V.** 1992. Comparisons between two monoclonal antibodies that bind to the same antigen but have differing affinities: uptake kinetics and 125I-antibody therapy efficacy in multicell spheroids. *Cancer Res.* 52: 4728.
- 20 33 **Hawkins, R.E., Russel, S.J., Baier, M., & Winter, G.** 1993. The contribution of contact and non-contact residues of antibody in the affinity of binding to antigen. *J. Mol. Biol.* 234: 958.
- 34 **Tomlinson, I.M.T., Walter, G., Jones, P.T., Dear, P.H., Sonhammer, E.L-L., & Winter, G.** 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J. Mol. Biol.* 256: 813.
- 25 35 **Fujimori, K., Covell, D.C., Fletcher, J.E., & Weinstein, J.N.** 1989. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of IgG, F(ab')₂ and Fab in tumors. *Cancer Res.* 49: 5656.
- 30 36 **Sung, C., Shockley, T.R., Morrison, P.F., Dvorak, H.F., Yarmush, M.L., & Dedrick, R.L.** 1992. Predicted and observed effects of antibody affinity and antigen density on monoclonal antibody uptake in solid tumors. *Cancer Res.* 52: 377.
- 37 **Van de Winkel, J.G.J., & Capel, P.J.A.** 1993. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immuno. Today.* 14: 215.
- 35 38 **Van de Winkel, J.G.J., Boonen, G.J.J.C., Janssen, P.L.W., Vlug, A., Hogg, N., & Tax, W.J.M.** 1989. Activity of two types of Fc receptors, FcγRI and FcγRII, in human monocyte cytotoxicity to sensitized erythrocytes. *Scand. J. Immunol.* 29: 23.
- 40 39 **Torigoe, C., Inman, J., & Metzger, H.** 1998. An unusual mechanism for ligand antagonism. *Science.* 281: 568.
- 40 40 **McKeithan, T.W.** 1995. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5042.
- 45 41 **Torigoe, C., Goldstein, B., Wofsy, C., & Metzger, H.** 1997. Shuttling of initiating kinase between discrete aggregates of the high affinity receptor for IgE regulates the cellular response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1372.
- 42 **Seya, T., Hara, T., Matsumoto, M., & Akedo, H.** 1990. Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. *J. Immunol.* 145: 238.
- 50 43 **Panneerselvam, M., Welt, S., Old, L.J., & Vogel, C-W.** 1986. A molecular mechanism of complement resistance of human melanoma cells. *J. Immunol.* 136: 2534.
- 55 44 **Cheung, N-K, V., Walter, E.I., Smith-Mensah, W.H., Ratnoff, W.D., Tykocinski, M.L., & Medof, M.E.** 1988. Decayaccelerating factor protects human tumor cells from complement-mediated cytotoxicity *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 81: 1122.
- 45 **Kumar, S., Vinci, J.M., Pytel, B.A., & Baglioni, C.** 1993. Expression of messenger RNAs for complement inhibitors in human tissues and tumors. *Cancer Res.* 53: 348.
- 60 46 **Gorter, A., Block, V.T., Haasnoot, W.H.B., Ensink, N.G., Daha, M.R., & Fleuren, G.J.** 1996. Expression of CD46, CD55, and CD59 on renal tumor cell lines and their role in preventing complement-mediated tumor cell lysis. *Lab. Invest.* 74: 1039.
- 65 47 **Berends, D., van der Kwast, T.H., de Both, N.J., & Mulder, P.G.** 1989. Factors influencing antibody-mediated cytotoxicity during the immunotherapy of Rauscher-virus-induced myeloid leukemic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 28: 123.

ES 2 282 797 T3

- 48 De **Kruif**, J., **Boel**, E., & **Logtenberg**, T. 1995. Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J. Mol. Biol.* 248: 97.
- 49 **Boel**, E. PhD. Thesis. 1998. University of Utrecht, The Netherlands.
- 50 **Balzar**, M., **Bakker**, H.A., **Briaire-de-Bruijn**, I.H., **Fleuren**, G.J., **Warnaar**, S.O., & **Litvinov**, S.V. 1998. Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4833.
- 51 **Martin**, A.C.R. & **Thornton**, J.M. 1996. Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application of antibodies. *J. Mol. Biol.* 263: 800.
- 52 **Kwong**, P.D., **Wyatt**, R., **Robinson**, J., **Sweet**, R.W., **Sodroski**, J., & **Hendrickson**, W.A. 1998. Structure of an HIV Gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 393: 648.
- 53 **Sussman**, J.L., *et al.* 1998. Database of Three-Dimensional Structure Information of Biological Macromolecules. *Acta Cryst.* D54: 1078.
- 54 **Pei**, X.Y., **Holliger**, P., **Murzin**, A.G., & **Williams**, R.L. 1997. The 2.0-Å resolution crystal structure of a trimeric antibody fragment with noncognate VH-VL domain pairs shows a rearrangement of VH CDR3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 9637.
- 55 **Williams**, G., *et al.* 1995. Dissection of the extracellular human interferon gamma receptor alpha-chain into two immunoglobulin-like domains. Production in an *Escherichia coli* thioredoxin gene fusion expression system and recognition by neutralizing antibodies. *Biochemistry* 34: 1787.
- 56 **Haynes**, M.R., **Stura**, E.A., **Hilvert**, D., & **Wilson**, I.A. 1994. Routes to catalysis: structure of a catalytic antibody and comparison with its natural counterpart. *Science.* 263: 646.
- 57 **Vriend**, G. 1990. WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8: 52.
- 58 **Laskowski**, R.A., **MacArthur**, M.W., **Moss**, D.S., & **Thornton**, J.M. 1993. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 265: 283.
- 59 **McDonald**, I.K., & **Thornton**, J.M. 1994. Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J. Mol. Biol.* 238: 577.
- 60 **Wallace**, A.C., **Laskowski**, R.A. & **Thornton**, J.M. 1995. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 8: 127.
- 61 **Altschul**, S.F., *et al.* 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389.
- 62 **Valerius**, T., *et al.* 1993. Involvement of the high affinity receptor for IgG (FcγRI:CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during G-CSF therapy. *Blood.* 82: 931.
- 63 Van **Strijp**, J.A.G., van **Kessel**, K.P.M., van der **Tol**, M.E., & **Verhoef**, J. 1989. Complement-mediated phagocytosis of herpes simplex virus by human granulocytes: binding or ingestion. *J. Clin. Invest.* 84: 107.
- 64 **Velders**, M.P., van **Rhijn**, C.M., **Oskam**, E., **Fleuren**, G.J., **Warnaar**, S.O., & **Litvinov**, S.V. 1998. The impact of antigen density and antibody affinity on antibody-dependent cellular cytotoxicity: relevance for immunotherapy of carcinomas. *Br. J. Cancer.* 74: 478.
- 65 **Hjelstuen**, M.H., **Rasch-Halvorsen**, K., **Bruland**, O., & De L **Davies**, C. 1998. Uptake, penetration, and binding of monoclonal antibodies with increasing affinity in human osteosarcoma multicell spheroids. *Anticancer Res.* 18: 3153.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal humano que puede unirse a Ep-CAM humano **caracterizado** porque el anticuerpo comprende:
- 10 a). una región de CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos GGTFSSY, una región de CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos IPIFGT, una región de CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos DPFLHY, una región de CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos RSSQSLHNSNGYNYLD, una región de CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos LGSNRAS, y una región de CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos MQALQTTF,
- 15 b). una región de CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos GGTFSSY, una región de CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos IPIFGT, una región de CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos DPFLHY, una región de CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos RASQTISNNYLA, una región de CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos AASSRAT, y una región de CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos AQGELYPRQF, o
- 20 c). una región de CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos GGTFSSY, una región de CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos VPIFGT, una región de CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos DPFLHY, una región de CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos RASQSVSSYLA, una región de CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos GASSRA, y una región de CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos AQGELYPRQF.
- 25 2. Anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende una región de CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos GGTFSSY, una región de CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos IPIFGT, una región de CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos DPFLHY, una región de CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos RSSQSLHNSNGYNYLD, una región de CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos LGSNRAS, y una región de CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos MQALQTTF.
- 30 3. Anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.
- 35 4. Anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 2 ó 3, **caracterizado** porque el anticuerpo comprende una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
- 40 5. Anticuerpo monoclonal humano según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, **caracterizado** porque el anticuerpo tiene una constante de afinidad para Ep-CAM humano de 6 nM.
- 45 6. Anticuerpo monoclonal humano según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, **caracterizado** porque el anticuerpo tiene una actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo que es superior a la actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo de un anticuerpo monoclonal humano que puede unirse a Ep-CAM humano que tiene una constante de afinidad para Ep-CAM humano que es inferior a 6 nM.
- 50 7. Anticuerpo monoclonal humano según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado** porque el anticuerpo es una molécula de IgG1.
- 55 8. Anticuerpo monoclonal humano según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, **caracterizada** porque el anticuerpo está marcado con fluorescencia.
- 60 9. Anticuerpo monoclonal humano según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso como un medicamento.
- 65 10. Uso de un anticuerpo monoclonal humano según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor.
11. Uso según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el tumor es un tumor sólido.
12. Uso según la reivindicación 10 u 11, **caracterizado** porque el tumor es un carcinoma de colon.

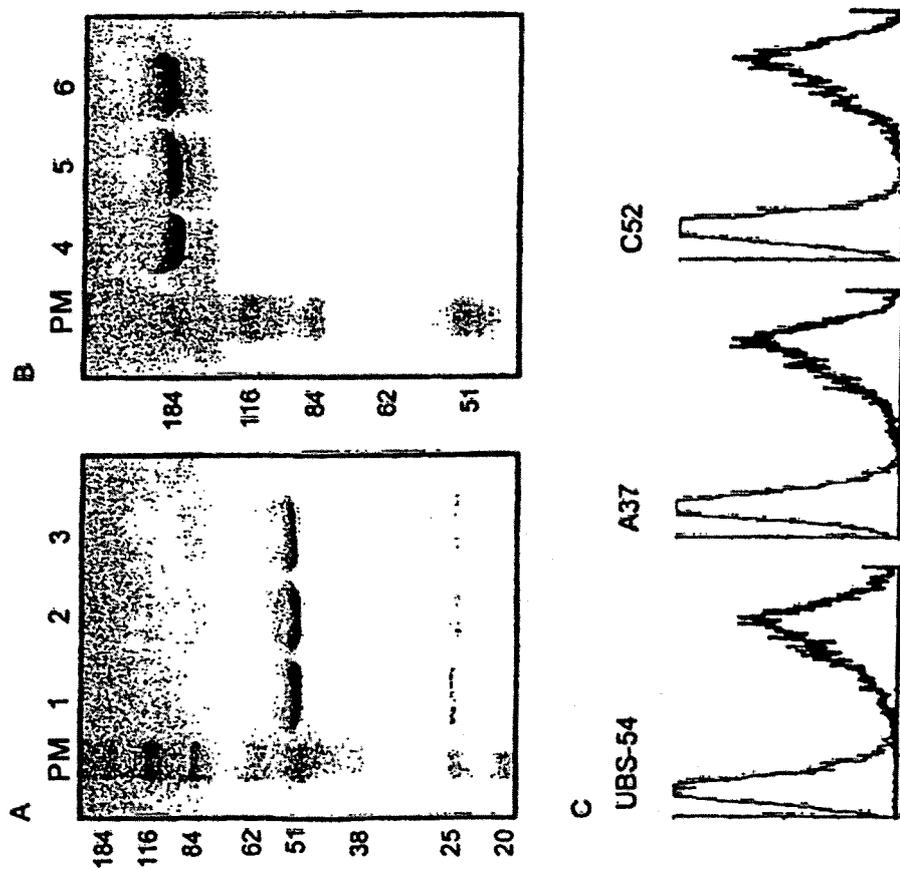


Fig. 1

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
UBS-54	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVCSKAS	GGTFSSY	AIISWVROAPGQGLEMMGGI	IPIFOT	ANYAQKPGQRVTTITADESTSTAYMELSLRSEDTAVYYCAR	DPFLHY	WQQTLLVT
A37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C52	-----A--K-----	-----	-----V-----	-----	-----	-----	-----
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
UBS-54	EIELTQSPLSLPTFGEPASISCS	RSSQSLHNSGNYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	LOSNRAS	GVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MOALQT	FTF
A37	-----GTLSLS-----R-TL--	-A--TISN	---A--Q--R--A--R-----	AA-S--T	-I-----T-----T---L-P--FA---	A-GELYPROP	-G---L--
C52	-----	---SV-S	S--	-----P-----G-----	-----S-----	-----	-----D--

Fig. 2

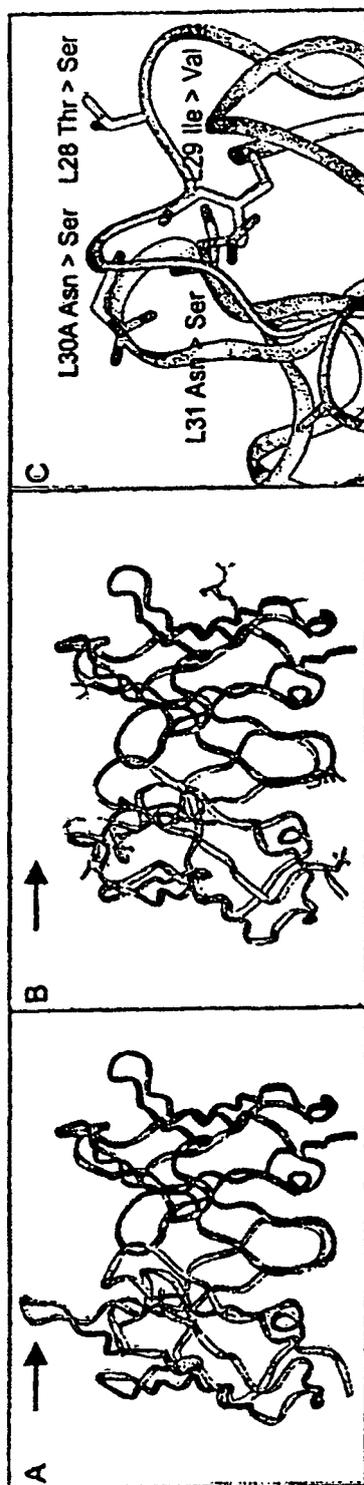


Fig. 3

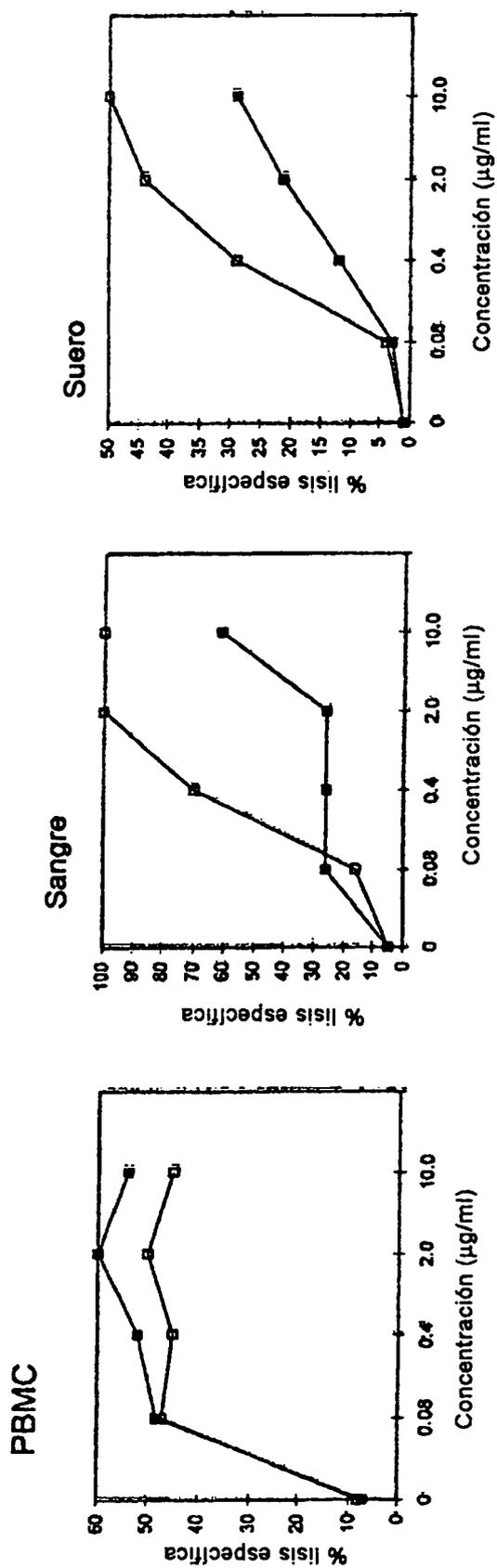


Fig. 4

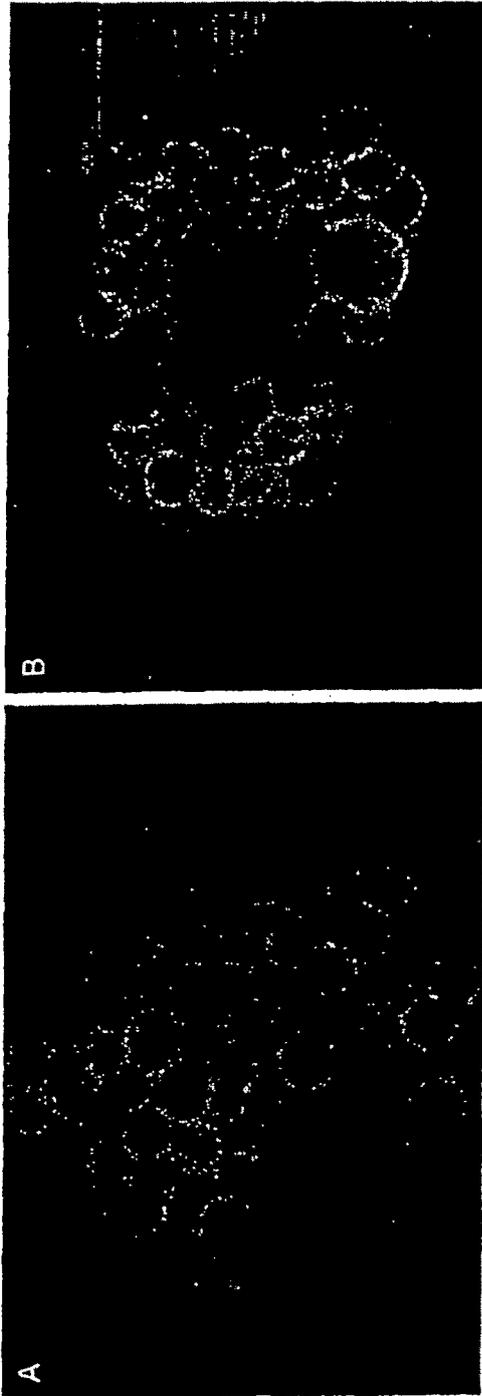


Fig. 5

ES 2 282 797 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Crucell Holland B.V.
- 5 <120> Uso de un epítipo nativo para seleccionar miembros de unión desarrollados a partir de una biblioteca de mutantes de una proteína que puede unirse a dicho epítipo
- <130> 0053 EP 02 DIV
- <140> EP04102692.3
- 10 <141> 14-06-2004
- <150> EP99204561.7
- <151> 27-12-1999
- <160> 14
- 15 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 37
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador Vkappa2-NCO-I
- 25 <400> 1
- gctccacct ccatgggata ttgtgatgac tcagtct 37
- 30 <210> 2
- <211> 43
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador Vkappa2-XHO-I
- 40 <400> 2
- gctccacct ctcgagctgc tgacagtaat aagttgcaaa atc 43
- 45 <210> 3
- <211> 41
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
- <223> Cebador NCO-I-VH1
- 55 <400> 3
- gctccacct ccatggccca ggtgcagctg gtgcagtctg g 41
- <210> 4
- 60 <211> 39
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 65 <220>
- <223> Cebador VH XHO-I

ES 2 282 797 T3

<400> 4

gcctccacct ctcgagtctc gcacagtaat acacggccg

39

5

<210> 5

<211> 87

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de adición conocida XHO-HCDR3-UBS-54

<220>

15

<221> misc_feature

<222> (43)..(60)

20

<223> en la que "n" en las posiciones 43, 44 y 45 representa ATA, CAT, AGG o ACC; en las posiciones 46, 47, 48 representa GTG, AAA, CTT o GGC; en las posiciones 49, 50 y 51 representa AAG, CTA, AGT o ACC; en las posiciones 52, 53 y 54 representa AAA, CTT, AGG o ACC; y en las posiciones 58, 59 y 60 representa GTA, AAT, CGG o GCC

<400> 5

25

```

gcctccacct ctcgagtctc gcacagtaat acacggccg 60
tcctgcaagc taatcaccgg ccgtatc 87
    
```

30

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región CDR3 de cadena pesada

40

<400> 6

Asp Pro Phe Leu His Tyr
1 5

45

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región CDR3 de cadena ligera

55

<400> 7

Met Gln Ala Leu Gln Thr Phe Thr Phe
1 5

60

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región CDR2 de cadena pesada

ES 2 282 797 T3

<400> 8

Ile Pro Ile Phe Gly Thr
1 5

5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región CDR1 de cadena pesada

15

<400> 9

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

20

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada variable de UBS-54

30

<400> 10

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

35

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

40

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

45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

50

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

55

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

Ala Arg Asp Pro Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

<210> 11

60

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65

<223> Cadena ligera variable de UBS-54

ES 2 282 797 T3

<400> 11

Glu Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Gln Ile
 100 105 110

<210> 12

<211> 222

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Secuencia de aminoácidos de UBS-54

<400> 12

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

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Glu Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 115 120 125

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

65

ES 2 282 797 T3

130 135 140

5 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 145 150 155 160

 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 165 170 175

10 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 180 185 190

 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 195 200 205

15 Leu Gln Thr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile
 210 215 220

20 <210> 13
 <211> 219
 <212> PRT
25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de A37

30 <400> 13

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 3 10 15

35 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

45 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

55 Ala Arg Asp Pro Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

60 Glu Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 115 120 125

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Asn

