

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 546**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2015** **PCT/US2015/026595**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015** **WO15161311**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2015** **E 15780559 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020** **EP 3131581**

54 Título: **Anticuerpos humanizados anti-antígeno-TF**

30 Prioridad:

18.04.2014 US 201461981240 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2021

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION OF THE STATE
UNIVERSITY OF NEW YORK (100.0%)
University at Buffalo, Office of Science,
Technology Transfer and Economic Outreach,
Baird Research Park, Suite 111, 1576 Sweet
Home Road
Amherst, NY 14228-2567, US**

72 Inventor/es:

**RITTENHOUSE-OLSON, KATE;
ABDULLAH, JULIA;
ENG, JING YING y
KOURY, STEPHEN T.**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 843 546 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados anti-antígeno-TF

5 Campo

La presente divulgación se refiere generalmente a anticuerpos humanizados que reconocen el antígeno tumoral humano de Thomsen-Friedenreich (TF) y métodos para usar los anticuerpos monoclonales.

10 Antecedentes

Durante la carcinogénesis, se producen alteraciones en la biosíntesis de estructuras de carbohidratos en la superficie celular, y se ha reconocido que varios carbohidratos diferentes unidos a proteínas o lípidos son antígenos asociados a tumores. El disacárido de Thomsen-Friedenreich (TF) (Gal β 1-3GalNAc α) se encuentra típicamente O-unido a residuos de serina o treonina. El TF-Ag (también conocido como antígeno T) se ha asociado con varios carcinomas humanos, incluidos los que se encuentran en el páncreas, colon y mama, y sobre esta base se ha denominado como un marcador de pancarcinoma. El TF-Ag se oculta del sistema inmune en los tejidos adultos normales por extensión con cadenas de glicanos más grandes. En el cáncer, la maquinaria de glicosilación celular puede alterarse lo que da lugar al truncamiento de estas cadenas y la exposición del antígeno TF. Son deseables nuevos anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos de los mismos que puedan dirigirse a TF-Ag, y se proporcionan mediante la presente divulgación.

El documento US2006018913 se refiere a la administración del anticuerpo monoclonal JAA-F11 a un individuo para inhibir la metástasis y/o inhibir el crecimiento de células que expresan TF-Ag, o para la detección de tumores o focos metastásicos que expresan TF-Ag. El documento US2006018913 se refiere a administrar al individuo una cantidad terapéutica de mAb JAA-F11, en donde el mAb JAA-F11 inhibe la metástasis y/o el crecimiento de las células cancerosas que expresan TF-Ag. El documento US2006018913 también se refiere a conjugar el mAb JAA-F11 a un marcador detectable y administrarlo al individuo, por lo que la detección del marcador identifica focos metastásicos o tumores que comprenden células cancerosas que expresan TF-Ag.

El documento US2005260680 se refiere a métodos para diagnosticar trastornos autoinmunes seleccionados del grupo que consiste en el Síndrome de Sjögren y lupus en un sujeto, en base a la detección de una diferencia entre el sujeto y los individuos normales en los niveles de clases y/o subclases de anticuerpos individuales que son específicos para antígenos similares a Tf. El documento US2005260680 también se refiere a métodos para tratar trastornos autoinmunes seleccionados del grupo que consiste en el Síndrome de Sjögren y lupus en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un antígeno similar a Tf o un anticuerpo al mismo.

Resumen

La presente divulgación comprende composiciones y métodos para la terapia de cánceres TF+.

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une con especificidad a Gal β 1-3GalNAc- α de TF-Ag, como se establece en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas.

La divulgación comprende anticuerpos monoclonales (mAb) parcialmente humanizados o fragmentos de los mismos que se unen con especificidad a TF-Ag. El mAb o fragmento del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMG
FISPNTDYTEYNQKFRDRVMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSFIGYNFDF WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:7) (H1);
EVQLLESAGELKKPGASVKVSCKASGYFTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGF
ISPNTDYTEYNQKFRDRVTLTADKSSSTAYMELSSLTSEDVAVYYCARSFIGYNFDF WGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO:8) (H2); y
EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTTYWMHWVKAPGQGLEWIGFI
SPNTDYTEYNQKFRDKATMTADTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSFIGYNFDF WGQGTTLLTVSS (SEQ ID NO:9) (H3) y combinaciones de las mismas.

La cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWVFQQRPGQSPRLIY
KVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:10) (L1);
L2DIVMTQTPLSLPVTLGQPASISRSSQTIVYSNGNTYLEW
FQQRPGQSPRLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQGSHPVPTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:11) (L2); y

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQRPQGSPRLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:12) (L3); y combinaciones de las mismas.

5 Se hicieron y probaron versiones adicionales H2, H3, L2 y L3. Estos incluyen los siguientes:

Región variable pesada H2a:

10 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGGGLEWMG
FISPNTDYTEYNQKFRDRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSFIGYNFDF
WGQGTTVTVS (SEQ ID NO:13)

15 Región variable pesada H3a:

20 EGQLLESGLAELAKPGASVKMSCKASGYTFTTYWMHWVKKRPGQGLEWIGFI
SPNTDYTEYNQKFRDKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSDDSAVYYCARSFIGYNFDF
WGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:14)

25 Región variable ligera L2a:

30 DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKVDIK
(SEQ ID NO:15)

35 Región variable ligera L3a:

40 ELVMTQTPLSLPVNLGDQASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEI
K (SEQ ID NO:16).

45 Las combinaciones de cadenas pesadas y variables incluidas en esta divulgación son: H1-L1; H1-L2; H1-L2a; H1-L3; H1-L3a; H2-L1; H2-L2; H2-L2a; H2-L3; H2-L3a; H3-L1; H3-L2; H3-L2a; H3-L3; H3-L3a; H2a-L1; H2a-L2; H2a-L2a; H2a-L3; H2a-L3a; H3a-L1; H3a-L2; H3a-L2a; H3a-L3; y H3a-L3a.

En modalidades, el mAb comprende una región constante de IgG humana. En modalidades, el mAb se conjuga con un agente seleccionado del grupo que consiste en fármacos quimioterapéuticos, toxinas e isótopos radiactivos.

50 La divulgación comprende un método para la profilaxis y/o terapia del cáncer en un individuo, en donde el cáncer comprende células cancerosas que expresan TF-Ag. El método comprende administrar al individuo uno o más mAb o los fragmentos como se describió anteriormente, en donde el crecimiento, o supervivencia, o metástasis, o una combinación de los mismos, de las células cancerosas en el individuo se inhibe posterior a la administración. En otro aspecto, se proporcionan uno o más mAb del primer aspecto de la invención para usar en un método para la
55 profilaxis y/o terapia del cáncer en un individuo, en donde el cáncer comprende células cancerosas que expresan TF-Ag, como se establece en las reclamaciones adjuntas.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el mAb, como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

60 En otro aspecto, se proporciona un cultivo celular *in vitro*, en donde las células del cultivo celular expresan el mAb, como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

65 La divulgación proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican los mAb y fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos, vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos y cultivos celulares *in vitro* que

comprenden dichos vectores de expresión. El mAb o fragmento de unión a TF-Ag del mismo puede estar codificado por más de un vector de expresión.

Se divulgan métodos para fabricar los mAb y fragmentos de unión a TF-Ag del mismo, y generalmente comprenden expresar los mAb o fragmentos de unión a TF-Ag, o combinaciones de los mismos en un cultivo celular *in vitro*, y separar los mAb o fragmentos de unión a TF-Ag, o combinaciones de los mismos, del cultivo celular.

También se divulgan estuches que comprenden los mAb y fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona los alineamientos de la secuencia de aminoácidos de las regiones de variable pesada de JAA-F11 y las tres variantes VH (H1, H2 y H3) que se incluyen en esta divulgación. Negrita indica aminoácidos idénticos entre JAA-F11 y las cadenas H humanizadas diseñadas; los aminoácidos en negrita y sombreados indican diferencias entre las cadenas humanizadas diseñadas y JAA-F11 de ratón. La alanina en la posición 72 que se muestra en negrita y en cursiva es un residuo de ratón que se retuvo para evitar choques estéricos. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están en cursiva. La numeración es de acuerdo con el sistema Kabat. La secuencia de mJAAF11 es la SEQ ID NO:17. La secuencia H1 es la SEQ ID NO:7; la secuencia H2 es la SEQ ID NO:8; la secuencia H3 es la SEQ ID NO:9.

La Figura 2 representa alineamientos de secuencias de aminoácidos de las regiones de variable ligera de mJAA-F11 (JAA-F11VH) y tres variantes VL (L1, L2 y L3). Negrita indica aminoácidos de ratón o aminoácidos idénticos a la secuencia de ratón, los aminoácidos en negrita y sombreados son diferencias entre las variantes de JAA-F11 humanizadas diseñadas y JAA-F11 de ratón. La leucina en la posición 51, que se muestra en negrita y en cursiva, es un residuo de ratón que se retuvo para evitar choques estéricos. La secuencia de mJAAF11 es la SEQ ID NO:17. La secuencia L1 es la SEQ ID NO:10; la secuencia L2 es la SEQ ID NO:11; la secuencia L3 es la SEQ ID NO:12.

Figura 3. Determinación de la afinidad relativa mediante el uso de inhibición de mJAA-F11 por ELISA para evaluar la unión de cada hJAA-F11 y anticuerpo quimérico a TF-Ag-BSA. Las barras de error representan ± 1 error estándar.

Figura 4. Unión de hJAA-F11, JAA-F11 quimérico y de ratón (50 μ g/mL) a 10 líneas celulares de cáncer de mama. Las líneas celulares incluyen triple negativo (HCC 70, BT 549, MDA-MB-231, MDA-MB-468, DU 4475), ER/PR positivo (HCC 1419, AU 565, MDA-kb2) y HER2 positivo (CAMA-1, HCC 1428). Para todas las líneas celulares probadas anteriormente, la unión a hJAA-F11, JAA-F11 quimérico o de ratón (a 50 μ g/mL) fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) (prueba T de Student) que la del mieloma de control negativo de TF-Ag. Cada barra de error representa ± 1 desviación estándar.

Figura 5. El anticuerpo quimérico y los anticuerpos JAA-F11 humanizados excepto el H3L3 causaron una inhibición pequeña (~ 6-11 %) pero estadísticamente significativa del crecimiento de células tumorales. No se observó ninguna potenciación de la proliferación celular. No se observó ningún resultado significativo para ninguno de los anticuerpos a 2 o 1 μ g/mL.

Figura 6A. Actividad ADCC de constructos de ratón, quiméricos y 4 hJAA-F11 contra una línea celular de cáncer de mama humana positiva para TF-Ag (BT 549). Los resultados se presentan como porcentaje de lisis celular en células tratadas con anticuerpos en comparación con el 100 % de lisis de células. H2L2 y H3L3 mostraron estadísticamente más actividad ADCC que los anticuerpos quiméricos o de ratón ($p < 0,05$) en todos los casos en la línea celular humana. Este es el promedio representativo de todos los experimentos en PBMC del Donante # 1 y del Donante # 2 (más de 3 experimentos independientes). Las barras de error representan ± 1 error estándar.

Figura 6B. Actividad ADCC de constructos de ratón, quiméricos y 4 hJAA-F11 contra una línea celular de cáncer de mama humana positiva a TF-Ag (BT 549) en PBMC Donante # 1. Los resultados se presentan como porcentaje de lisis celular en células tratadas con anticuerpos en comparación con 100 % de lisis de células. H2L2 y H3L3 mostraron estadísticamente más actividad ADCC que los anticuerpos quiméricos o de ratón ($p < 0,05$) en todos los casos en la línea celular humana. Este es el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Las barras de error representan ± 1 error estándar.

Figura 6C. Actividad ADCC de constructos de ratón, quiméricos y 4 hJAA-F11 contra una línea celular de cáncer de mama humana positiva a TF-Ag (BT 549) en PBMC del Donante #2. Los resultados se presentan como porcentaje de lisis celular en células tratadas con anticuerpos en comparación con el 100 % de lisis de células. H2L2 y H3L3 mostraron estadísticamente más actividad ADCC que los anticuerpos quiméricos o de ratón ($p < 0,05$) en todos los casos en la línea celular humana. Este es el promedio de al menos 3 experimentos independientes. Las barras de error representan ± 1 error estándar.

Figura 6D. Actividad ADCC de constructos de ratón, quiméricos y 3 hJAA-F11 contra la línea celular de cáncer de mama de ratón positiva a 4T1 TF-Ag. Los resultados se presentan como porcentaje de lisis celular en células tratadas con anticuerpos en comparación con 100 % de lisis de células. H3L3 y quimérico mostraron estadísticamente más actividad ADCC que el anticuerpo de ratón ($p < 0,05$). Las barras de error representan ± 1 error estándar. La ADCC se realizó solo una vez con PBMCs del Donante #3.

Figura 7. Los JAA-F11 humanizados, quiméricos y de ratón no inducen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés). La actividad CDC de constructos de ratón, quiméricos y 2 hJAA-F11 contra la línea celular de cáncer de mama humana HCC 1428 se probaron. Los resultados se presentan como porcentaje de lisis celular en células tratadas con anticuerpos en comparación con el 100 % de lisis de

células. Control positivo: células positivas a LDH incluidas en el estuche de reactivos mostraron lisis. Las barras de error representan ± 1 error estándar.

Figura 8. Internalización de anticuerpos de ratón, quiméricos y 4 hJAA-F11 mediante el uso de un inmunoensayo enzimático para medir la unión a la superficie. La internalización se analizó mediante la incubación de células de cáncer de mama de ratón 4T1 con anticuerpos a 37 °C o 4 °C. Como se esperaba, el patrón fue opuesto al patrón de ADCC mostrado para H3L3 en la figura 20 pero fue inesperado para H2L2 que indujo ADCC y se internalizó. El Ab de ratón, H2L2, quimérico, H2L3 y H1L1 se internalizaron significativamente ($p < 0,05$). Las barras de error representan ± 1 error estándar.

Figura 9. Imágenes de MicroPET que muestran la inmunolocalización del anticuerpo hJAA-F11 en un ratón portador del tumor 4T1.

Figura 10. Imágenes de MicroPET que muestran la localización del 124Yodo libre en la tiroides en un ratón portador del tumor 4T1.

Divulgación detallada

La presente divulgación comprende distintos anticuerpos monoclonales humanizados (mAb) y fragmentos de los mismos que reconocen específicamente TF-Ag, métodos para preparar los mAb y métodos para usar los mAb para profilaxis y/o fines terapéuticos y para diagnóstico por imagen. Las secuencias de aminoácidos de los mAb proporcionados por esta divulgación se desarrollaron mediante el uso de un enfoque novedoso para cambiar las secuencias de aminoácidos en el mAb producido por un hibridoma depositado con el número de catálogo de ATCC CRL-2381, de modo que las regiones marco de los mAb incorporen secuencias de inmunoglobulina (Ig) murina y humana de forma guiada que mantiene la especificidad y reduce la inmunogenicidad. El hibridoma produce un mAb conocido como JAA-F11. Los cambios introducidos en la secuencia de JAA-F11 en el contexto de las regiones marco murinas dan como resultado un conjunto de tres cadenas variables pesadas distintas y tres ligeras distintas que se pueden combinar para producir veinticinco mAb distintos que son adecuados para combatir cualquiera de las variedades de cánceres que comprenden células cancerosas que expresan TF-Ag. Además, los mAb tienen características deseables que los hacen particularmente adecuados para inducir preferentemente distintos mecanismos anticancerígenos en un individuo. Por ejemplo, en dependencia de la elección de cadena pesada y ligera, la divulgación incluye proporcionar la estimulación de la citotoxicidad dependiente del anticuerpo potenciada, o la citotoxicidad dependiente del complemento, o la internalización del mAb.

La divulgación incluye secuencias de CDR del mAb JAA-F11. Estos son: **cadena VH:** CDR1: SGYTFTTYWMH; (SEQ ID NO:1); CDR2: FISPNTDYTEYNQKFRD; (SEQ ID NO:2); CDR3: RSFIGYNFDFWGQGT; (SEQ ID NO:3); y **cadena VL:** CDR1: CRSSQTIVYSNGNTYLEW; (SEQ ID NO:4); CDR2: KVSNRFSGVDP; (SEQ ID NO:5); y CDR3: CFQGSHPFTFGSG; (SEQ ID NO:6).

Las secuencias de CDR se colocan en el contexto de secuencias marco modificadas. Como consecuencia, los mAb y fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos comprenden una cadena pesada seleccionada de:

H1 - EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLE
WMGFISPNTDYTEYNQKFRDRVTMTADTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARSFIGY NDFDWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO:7);

H2 - EVQLLES GAELKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEW
MGFISPNTDYTEYNQKFRDRVTLTADKSSSTAYMELSSLTSEDVAVYYCARSFIGYN FDFWGQGTTLTVSS (SEQ
ID NO:8);

H3 - EVQLVESGAIEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYWMHWVKAPGQGLE
WIGFISPNTDYTEYNQKFRDKATMTADTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARSFIGY NDFDWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO:9) y combinaciones de las mismas;

y una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en:

L1 - DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQTIVYSNGNTYLEW FQQRPGQSP RLLIY
KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQGSHPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:10);

L2 - DIVMTQTPLSLPVTLGQPASIS CRSSQTIVYSNGNTYLEW FQQRPGQSP RLLIY
KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQGSHPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO: 11);

L3 - DVVMTQSPLSLPVTLGQPASIS CRSSQTIVYSNGNTYLEW YLQRPQSPRLLIY
KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQGSHPFTFGSG TKLEIK (SEQ ID NO:12) y
combinaciones de las mismas.

Además de las secuencias anteriores, se hicieron y probaron las siguientes cadenas pesadas y ligeras en ciertas combinaciones:

Región variable pesada H2a:

5 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMG
FISPNTDYTEYNQKFRDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED⁵TA⁵VYYCAR⁵SFIGYNFDF
WGQGT⁵TVTVS (SEQ ID NO:13)

10 Región variable pesada H3a:

EGQLLESGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTTYWMHWVKKRPGQGLEWIGFI
15 SPNTDYTEYNQKFRDKATLTADKSSTAYMQLSSLTSDDSA¹⁵VYYCAR¹⁵SFIGYNFDF
WGQGT¹⁵TLTVSS (SEQ ID NO:14)

Región variable ligera L2a:

20 DIVMTQSPLSLPVT²⁰PGEPASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIY
KVS²⁵NRFS²⁵GV²⁵PDR²⁵FS²⁵GS²⁵SG²⁵TD²⁵FTL²⁵KIS²⁵VEA²⁵ED²⁵VG²⁵VYY²⁵CF²⁵Q²⁵GS²⁵H²⁵VP²⁵FT²⁵FG²⁵SG²⁵TK²⁵V²⁵DIK
(SEQ ID NO:15)

30 Región variable ligera L3a:

ELVMTQTPLSLPVNLGDQASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI
35 YKVS³⁵NRFS³⁵GV³⁵PDR³⁵FS³⁵GS³⁵SG³⁵TD³⁵FTL³⁵KIS³⁵VEA³⁵DDL³⁵GV³⁵VYY³⁵CF³⁵Q³⁵GS³⁵H³⁵VP³⁵FT³⁵FG³⁵SG³⁵TK³⁵LEI
K (SEQ ID NO:16).

40 La divulgación abarca mAb y fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos que comprenden secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en las secuencias anteriores. La divulgación comprende mAb y fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos, en donde el marco y las secuencias CDR consisten de SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, y SEQ ID NO:16. Un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une con especificidad a Gal β 1-3GalNAc- α de TF-Ag, el anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:13 (H2a); y en donde la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:15 (L2a) se establece en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas.

Por tanto, las siguientes 25 combinaciones de cadena pesada y ligera se abarcan en esta divulgación: H1-L1; H1-L2; H1-L2a; H1-L3; H1-L3a; H2-L1; H2-L2; H2-L2a; H2-L3; H2-L3a; H3-L1; H3-L2; H3-L2a; H3-L3; H3-L3a; H2a-L1; H2a-L2; H2a-L2a; H2a-L3; H2a-L3a; H3a-L1; H3a-L2; H3a-L2a; H3a-L3; y H3a-L3a. La divulgación incluye mAb y fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos que comprenden una combinación de H1L1, H2L2, H3L3, H2L3, H2a y L2a, y H3a y L3a. En esta divulgación, además de los resultados para las combinaciones de cadenas H y L como se describe a continuación, se hicieron y probaron H2a-L2a y H3aL3a, y los resultados para estas dos combinaciones fueron similares a los reportados para H2-L2 y H3-L3, respectivamente. Las combinaciones H2a-L2a y H3a-L3a se hicieron como resultado de procedimientos de subclonación, lo que permitió la selección de subclones adicionales con características de unión potenciadas para TF-Ag, según lo determinado por la más alta reactividad en inmunoensayos enzimáticos (EIA, por sus siglas en inglés). De estos, los mejores para la internalización son H2L2 y H2aL2a, mientras que los mejores para ADCC son H2L2, H2aL2a, H3L3 y H3aL3a.

60 Las secuencias representativas de VH y VL se describen adicionalmente mediante las figuras 1 y 2. En particular, la figura 1 proporciona los alineamientos de la secuencia de aminoácidos de las regiones de variable pesada de JAA-F11 y las tres variantes VH (H1, H2 y H3) que se incluyen en esta divulgación. Negrita indica aminoácidos idénticos entre JAA-F11 y las cadenas H humanizadas diseñadas; los aminoácidos en negrita y sombreados indican diferencias entre las cadenas humanizadas diseñadas y JAA-F11 de ratón. La alanina en la posición 72 que se muestra en negrita y en cursiva es un residuo de ratón que se retuvo para evitar choques estéricos. Las CDR están en cursiva. La numeración es de acuerdo con el sistema Kabat. Por tanto, se reconocerá que, aunque los mAb

descritos en la presente descripción se denominan "humanizados", comprenden ciertos residuos murinos y, por tanto, pueden considerarse parcialmente humanizados.

La figura 2 representa alineamientos de secuencias de aminoácidos de las regiones variable ligera de mJAA-F11 (JAA-F11VH) y tres variantes VL (LI, L2 y L3). Negrita indica aminoácidos de ratón o aminoácidos idénticos a la secuencia de ratón, los aminoácidos en negrita y sombreados son diferencias entre las variantes de JAA-F11 humanizadas diseñadas y JAA-F11 de ratón. La leucina en la posición 51, que se muestra en negrita y en cursiva, es un residuo de ratón que se retuvo para evitar choques estéricos. Resultará evidente a partir de las figuras 1 y 2 que las cadenas H y L humanizadas proporcionadas actualmente comprenden diferencias del anticuerpo de ratón JAA-F11 y diferencias entre sí, pero se han retenido ciertos aminoácidos murinos para mantener la especificidad de los mAb humanizados.

También se divulgan fragmentos de los mAb humanizados descritos en la presente descripción. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos adecuados incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, ScFv y Fv. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos y se incluyen en el alcance de esta divulgación. Los mAb o fragmentos de los mismos pueden producirse en células huésped mediante vectores de expresión recombinantes. La presente divulgación incluye todas las secuencias de polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción, los vectores de expresión que comprenden tales secuencias de polinucleótidos y los cultivos celulares *in vitro* que comprenden tales vectores de expresión. Los cultivos celulares pueden ser células eucariotas. Los cultivos celulares pueden ser células de mamífero. Las células pueden ser células CHO. En la presente descripción se describen estuches que comprenden los mAb y/o fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos y/o cultivos celulares que expresan los mAb y/o fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos. En general, los estuches comprenden uno o más recipientes sellados que contienen los mAb y/o fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos, o células que los expresan. Las instrucciones para usar los mAb y/o los fragmentos de unión a TF-Ag con fines terapéuticos y/o de imágenes pueden incluirse en los estuches.

La divulgación puede incluir un método para fabricar los mAb o fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos, que comprende cultivar células que comprenden un vector de expresión u otra secuencia de polinucleótidos que codifica los mAb o fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos, lo que permite la expresión de los mAb o los fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos, y separar los mAb o fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos del cultivo celular. Las secuencias de nucleótidos que codifican los mAb o fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos pueden expresarse mediante el uso de cualquier vector de expresión adecuado, muchos de los cuales se conocen en la técnica y/o están disponibles comercialmente. Las cadenas pesada y ligera pueden expresarse en un único vector de expresión, como un plásmido. Las cadenas pesada y ligera pueden expresarse en distintos plásmidos en la misma célula, después de lo cual las cadenas pesada y ligera expresadas forman la arquitectura de mAb convencional. Los mAb o fragmentos de unión a TF-Ag de los mismos pueden aislarse y/o purificarse mediante el uso de técnicas convencionales, dado el beneficio de la presente divulgación.

La divulgación incluye un método para inhibir el crecimiento de células cancerosas en un individuo, y/o inhibir la metástasis de células cancerosas en un individuo, cuyas células cancerosas expresan moléculas de TF-Ag. El método comprende administrar al individuo una cantidad terapéutica de los mAb humanizados y/o fragmentos de los mismos, en donde la administración inhibe el crecimiento y/o inhibe la metástasis de las células cancerosas que expresan TF-Ag. La práctica del método de la invención puede reducir el volumen de un tumor y/o reducir la formación de focos metastásicos o tumores secundarios. El método se proporciona para un individuo que lo necesite. El individuo que lo necesita se puede haber diagnosticado, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar o tener una recurrencia de cáncer. Puede usarse una cantidad terapéuticamente efectiva de un mAb o un fragmento de unión a TF-Ag del mismo. El término "terapéuticamente efectiva" como se usa en la presente descripción significa que la cantidad de mAb o fragmento de unión a TF-Ag del mismo administrada es cantidad suficiente para inhibir el crecimiento, supervivencia y/o metástasis de células cancerosas TF+. En otro aspecto de la invención, se proporcionan uno o más mAb para usar en un método de profilaxis y/o terapia del cáncer en un individuo, en donde el cáncer comprende células cancerosas que expresan TF-Ag, el uso comprende administrar al individuo el uno o más mAb, en donde el crecimiento o la supervivencia o la metástasis, o una combinación de los mismos, de las células cancerosas en el individuo se inhiben posterior a la administración.

Los mAb humanizados y/o sus fragmentos se pueden conjugar con un agente quimioterapéutico para permitir la localización del agente quimioterapéutico en células cancerosas mediante la unión a células que expresan TF-Ag. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales conjugados de anticuerpos incluyen toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas. Las toxinas enzimáticamente activas adecuadas incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Los agentes quimioterapéuticos pueden unirse covalentemente al mAb o al fragmento de unión a TF-Ag del mismo mediante cualquier método de conjugación química adecuado. El agente quimioterapéutico puede comprender un segmento de una proteína de fusión con el mAb o el fragmento de unión de TF-Ag.

La divulgación incluye un método para identificar en un individuo focos metastásicos, tumores o combinaciones de los mismos, en donde los focos metastásicos o tumores comprenden células que expresan TF-Ag. El método comprende las etapas de administrar a los mAb humanizados individuales y/o fragmentos de los mismos, en donde los mAb humanizados y/o fragmentos de los mismos se han conjugado con un marcador detectable, y detectar el marcador detectable para identificar focos metastásicos, tumores o combinaciones de los mismos. Por tanto, los mAb humanizados y/o fragmentos de los mismos pueden conjugarse con un marcador detectable, tal como un agente radiactivo. Se encuentran disponibles una variedad de isótopos radiactivos para conjugar con mAb JAA-F11, de modo que las células a las que se unen los mAb JAA-F11 pueden formar imágenes o destruirse selectivamente. Para la destrucción selectiva de células que expresan TF-Ag, los mAb JAA-F11 pueden conjugarse con un átomo altamente radiactivo, como In111, At211, 1131, 1125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radiactivos de Lu.

Cuando los mAb humanizados y/o fragmentos de los mismos se usan para identificar células que expresan TF-Ag en focos metastásicos o en tumores, pueden comprender un átomo radiactivo para estudios scintigráficos, por ejemplo, Tc99m (tecnecio-99 metaestable), 1123 o un marcador giratorio para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imágenes de resonancia magnética o "IRM"), tales como 1123, 1131, 1124, F19, C13, N15, O17 o Gadolinio (III) o Manganese (II).

Los mAb humanizados marcados y/o fragmentos de los mismos pueden inyectarse en pacientes diagnosticados o sospechosos de tener una enfermedad metastásica para identificar focos metastásicos y/o tumores. La información de tal obtención de imágenes puede usarse para diagnosticar o establecer el estado de la enfermedad del paciente. El marcaje usado puede seleccionarse de acuerdo con el sistema de imágenes que se usará. Por ejemplo, Indio111, Tecnecio99 o Yodo 131 pueden usarse para exploraciones planas o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT, por sus siglas en inglés). En la tomografía por emisión de positrones pueden usarse marcadores emisores de positrones tal como Flúor19, Yodo 123 y Yodo 124. Los iones paramagnéticos tales como Gadolinio (III) o Manganese (II) pueden usarse en la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM). La localización del marcador dentro de un tejido particular del individuo permite la localización de focos metastásicos o tumores que comprenden células que expresan TF-Ag. Una concentración de marcador en una ubicación particular mayor que el fondo permite la identificación de la presencia de células metastatizadas. Después de la administración de mAb humanizados marcados y/o fragmentos de los mismos, se puede dejar pasar un período de tiempo adecuado de manera que los mAb humanizados no unidos y/o fragmentos de los mismos se eliminen del individuo de manera que el marcador de fondo se reduzca en gran medida.

Las formulaciones terapéuticas que comprenden mAb humanizados conjugados o no conjugados y/o fragmentos de los mismos pueden prepararse al mezclarlos con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como soroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG). Los mAb humanizados y/o fragmentos de los mismos pueden combinarse con otros agentes quimioterapéuticos en composiciones farmacéuticas.

Los mAb humanizados y/o fragmentos de unión a TF de los mismos pueden administrarse por cualquier medio adecuado, incluidos parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intralinfática o subcutánea. Además, los mAb humanizados y/o fragmentos de los mismos pueden administrarse adecuadamente mediante infusión de pulsos, por ejemplo, con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, con la máxima preferencia inyecciones intravenosas o subcutáneas, en dependencia en parte de si la administración es breve o crónica. Los mAb humanizados y/o fragmentos de los mismos pueden administrarse a un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer de mama, colon, próstata, ovario, vejiga u otros cánceres TF Ag+ para inhibir la metástasis o inhibir el crecimiento de las células cancerosas.

También pueden administrarse otros compuestos, tales como agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores y/o citoquinas. La administración combinada puede incluir la coadministración, mediante el uso de formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y también puede incluir la administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferentemente hay un período de tiempo mientras ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Los mAb humanizados y/o fragmentos de los mismos pueden administrarse a un ser humano u otro animal de acuerdo con los métodos de tratamiento antes mencionados en una cantidad suficiente para inhibir la metástasis y/o el crecimiento de células que expresan TF-Ag. Un experto en la técnica reconocerá que la forma y el carácter del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable viene dictado por la cantidad de ingrediente activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas, tales como el tamaño del individuo y la etapa de la enfermedad.

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo describe la fabricación y el uso de mAb humanizados de esta divulgación, y las propiedades físicas y funcionales de los mAb.

El mAb H2aL2a se establece en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas.

Diseño y construcción de JAA-F11 humanizado

Después de verificadas las secuencias de las regiones variables de JAA-F 11 de ratón, se definieron las CDR para mantener la especificidad y afinidad para TF-Ag. Las CDR inclusivas se definieron de acuerdo con Kabat y otros [139] y Chothia y otros [141] en base a la secuencia y la variabilidad estructural, respectivamente. Dos aminoácidos se consideran que están en contacto entre sí en una estructura de proteína si ambos contienen un par de átomos separados por 6 Å o menos [138]. La cristalografía de rayos X y los estudios enroscamiento computacional de carbohidratos en el ratón JAA-F 11 [142] identificaron residuos de aminoácidos dentro de 5-6 Å desde el sitio de unión. Estos aminoácidos, así como dos residuos de cisteína en la posición L23 y L88 de la cadena ligera que son importantes para la estructura conformacional, se incluyeron en la definición inclusiva final de las CDR usadas en la humanización de JAA-F11.

Selección de marcos humanos

Se aplicaron tres enfoques diferentes para seleccionar el marco del anticuerpo aceptor humano para las cadenas de la región variable JAAF11 pesada y ligera. Se diseñaron tres variantes de la cadena pesada (H1, H2, H3) y 3 variantes de la cadena ligera (L1, L2, L3). Cualquiera de las 3 cadenas pesadas (VH) puede emparejarse con cualquiera de las 3 cadenas ligeras (VL) para crear un total de 9 posibles variantes de combinación de hJAA-F11 VH/VL.

Para crear estas variantes, se realizó una búsqueda en BLAST al comparar por separado la secuencia VH y VL de mJAA-F11 (anticuerpo de ratón) con secuencias de inmunoglobulina humana. Las 10 secuencias VH y VL humanas más homólogas principales se alinearon con las regiones variables correspondientes de mJAA-F11 mediante el uso del programa Seaview Sequence Alignment.

Para las primeras variantes, H1 y L1, la secuencia de aminoácidos de las regiones marco se eligieron en base al aminoácido que se ve con mayor frecuencia en cada posición en las 10 secuencias variables de IgG humanas más homólogas principales. Para las variantes H2 y L2, la secuencia de aminoácidos de las regiones marco se eligieron de la siguiente manera: si el aminoácido en cualquiera de las 10 secuencias humanas principales coincidía con el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina de ratón, entonces se eligió ese aminoácido, en el resto posiciones se eligió el aminoácido que se ve con mayor frecuencia en las secuencias humanas. Para la tercera variante, H3 y L3, la secuencia de aminoácidos de la región marco contenía 3 aminoácidos de ratón a cada lado de cada CDR, mientras que el resto de la secuencia se compone de aminoácidos que se ven con mayor frecuencia en las 10 secuencias humanas principales.

También se construyó un JAA-F11 quimérico que consistía en la región variable JAA-F11 de ratón completa unida a regiones constantes humanas. El quimérico se hizo para verificar que se han clonado y secuenciado las regiones variables de ratón correctas y también para servir como control positivo cuando se evalúan los anticuerpos JAA-F11 humanizados. Se espera que el quimérico mantenga las mismas características de unión que el JAA-F11 de ratón, mientras que tiene la región constante humana.

Evaluación de modelos de hJAA-F11

Los constructos de hJAA-F11 originalmente propuestos se evaluaron para determinar los efectos conformacionales en el sitio de unión. Las tres variantes de cadena pesada (H1, H2, H3) tenían un reemplazo para alanina de arginina en la posición 72 que podría causar una interacción estérica grave con los aminoácidos circundantes. Se reemplazó una leucina en la posición 51 para las variantes de cadena ligera (L1, L2, L3) con arginina, lo que podría dar como resultado choques estéricos con las cadenas laterales de los aminoácidos circundantes. El residuo de arginina se eliminó y se reemplazó con el residuo del marco de JAA-F11 de ratón original, alanina 72 (VH) y leucina 51 (VL) como se muestra en las figuras 1 y 2. Las comparaciones de alineación entre las secuencias de aminoácidos variables ligeras y pesadas JAA-F11 de ratón y los constructos de hJAA-F11 son como se muestran en las figuras 1

y 2. Los expertos en la técnica también reconocerán las distinciones en las secuencias de aminoácidos presentadas en H2a, H3a, L2a y L3a, en comparación con las otras secuencias H y L.

Predicción de inmunogenicidad de variantes de hJAA-F11

Se prevé que la inmunogenicidad predicha mediante el uso de la puntuación T20 de nuestras variantes humanizadas (CDR injertadas) sea muy baja (tabla 1). La puntuación T20 se usa para medir la "humanidad" de las secuencias de la región variable del anticuerpo monoclonal. Este sistema de puntuación fue desarrollado por Gao y otros [Monoclonal antibody humanness score and its applications. 2013. BMC Biotechnology, 13:55], mediante el uso de una base de datos de más de 38 000 secuencias de anticuerpos humanos. En este método, se realiza una proteína BLAST de esta base de datos y el Ab humanizado de prueba se compara con estas secuencias humanas. El anticuerpo humanizado se compara con las 20 mejores coincidencias de BLAST del Ab humano y se puntúa por similitud con estas secuencias. La puntuación más alta posible es 100 (más parecida a la humana).

La validación de este método se demostró cuando Gao y otros probaron este método de puntuación de inmunogenicidad en más de 90 anticuerpos que se han usado clínicamente en humanos, y encontraron que los anticuerpos con puntuaciones T20 de secuencias de FR y CDR superiores a 80 no eran inmunogénicos, mientras que las puntuaciones T20 para las secuencias de FR solamente, que estaban por encima de 85, no eran inmunogénicas. Mediante el uso de los valores T20 de las variantes actuales de hJAA-F11, se espera una inmunogenicidad muy baja en los pacientes. Esto muestra que los anticuerpos injertados con CDR son más humanos y se espera que sean menos inmunogénicos que el quimérico, que la variante H1L1 es la más humana de las variantes injertadas con CDR y que todas las variantes de hJAA-F11 se espera tengan baja inmunogenicidad.

Tabla 1. Evaluación de la inmunogenicidad de los constructos de hJAA-F11. * puntuación > 80 para las secuencias de FR y CDR no es inmunogénica en humanos. ** puntuación > 85 para las secuencias de FR no es inmunogénica en humanos.

JAA-F11 variantes Quimérico	Puntuación T20 (FR y CDR)		Puntuación T20 (FR)	
	Cadena pesada	Cadena ligera	Cadena pesada	Cadena ligera
H1L1	67	78	77	86
H2L2	83	88	97	96
H3L3	76	87	90	95
	78	86	90	93

Expresión y producción de variantes de JAA-F11 humanizadas y quiméricas

Los genes hJAA-F11 y VH y VL quiméricos se clonaron en dos vectores de expresión de mamíferos diferentes que contenían la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana (6307 pAH) y la región constante de la cadena ligera kappa humana (6714 pAN), respectivamente, para producir plásmidos que contenían genes de IgG1 completa y kappa. La secuencia y orientación correctas de cada una de las regiones VH y VL clonadas en los vectores de expresión 6307 pAH y 6714 pAN se verificaron mediante secuenciación.

Después de la cotransfección estable de los dos vectores en células CHO-K1, se seleccionaron clones estables que expresaban hJAA-F11 o quimérico sobre la base de la resistencia a neomicina mediante el uso del antibiótico G418 y la expresión del quimérico o hJAA-F11. Se realizó la selección de los candidatos de hJAA-F11 mediante el uso de un ELISA para el anticuerpo anti-TF-Ag así como mediante el uso de técnicas establecidas. Los clones de la cotransfección de cada una de las variantes de combinación JAA-F11 H/L humanizada y el JAA-F11 quimérico que mostraron la mayor reactividad con TF-Ag se eligieron para caracterizaciones adicionales como se describe en la presente descripción. Los constructos de JAA-F11 humanizados y JAA-F11 quimérico se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía en columna de proteína A individualmente. Se han producido un anticuerpo quimérico, así como también H1L1, H2L2, H3L3 y H2L3, H2aL3a y H3aL3a. Dado el beneficio de la presente divulgación, el experto en la técnica puede producir fácilmente las combinaciones restantes de las cadenas H y L del anticuerpo que se abarcan en la presente invención.

Análisis de especificidad química por matriz de glicanos

Después de la selección inicial, la especificidad química de las variantes de hJAA-F11 y JAA-F11 quimérico se determinaron mediante el uso de una matriz de glicanos por el Consortium for Functional Glycomics. Estos datos se compararon con los datos obtenidos para el JAA-F11 de ratón. El análisis de matriz de glicanos es un método inmunofluorescente indirecto para determinar la reactividad de unión a glicanos de lectinas y anticuerpos. Se utilizó una matriz de glicanos anterior para demostrar la especificidad química del JAA-F11 de ratón. Este método se usó para analizar la reactividad de los anticuerpos candidatos con 610 glicanos diferentes. El hJAA-F11 H1L1, H2L2, H3L3 y el anticuerpo quimérico mostraron la misma fina especificidad de unión que el anticuerpo de ratón, incluida la limitación de la unión a las estructuras unidas a Gal β 1-3GalNAc- α (TF-Ag) y la falta de unión con estructuras α 2-3 sialiladas. La matriz de glicanos muestra que de 610 glicanos, los anticuerpos humanizados, el quimérico y el JAA-F11 de ratón solo se unen a TF-Ag y otras cuatro estructuras de sacáridos que contienen el TF-Ag. Los cuatro

sacáridos adicionales que los constructos JAA-F11 de ratón, el quimérico y hJAA-F11 unen, de los sacáridos 440 o 610 probados, no deberían ser biológicamente problemáticos para el direccionamiento tumoral con JAA-F11. Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3GalNAc β , GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc β y Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc β sin sustituir solo se han encontrado en fluidos excretados, en cáncer u otros estados de enfermedades. El Neu5Ac β 2-6 Gal β 1-3GalNAc no es una estructura natural y no se encuentra en humanos.

La especificidad de los constructos JAA-F11 humanizados parece ser la misma o incluso mejorada en comparación con los anticuerpos quiméricos y de ratón. Por ejemplo, H2L3 muestra estadísticamente ($p < 0,05$ por ANOVA) menos unión con cualquier adición de TF-Ag, y H1L1 y H2L2 no permiten que se agregue un disacárido al hidroxilo del C-6 de GalNAc y esto es estadísticamente diferente ($p < 0,05$) de los otros anticuerpos.

La falta de unión con más de 600 sacáridos negativos en la matriz indica una probable capacidad de direccionamiento para todos estos anticuerpos. Ejemplos importantes de sacáridos estrechamente relacionados que no se unen son las estructuras unidas a Gal β 1-3GalNAc-beta, lo que indica que el anticuerpo se uniría a los tejidos tumorales y no al gangliósido GM1 del sistema nervioso central, el asialo-GM1 de las células NK, el GDI de glicolípidos o al asialo-GM1 del tejido nervioso periférico (estos están unidos a beta). El conocido alargamiento de TF-Ag en tejidos normales se lleva a cabo por β 1-3N-acetilglucosaminil-transferasa al añadir GlcNAc β 1-3 sobre la Gal, lo que forma GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc-Sp8, o por una 2-3 sialiltransferasa que forma Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc (sialil-TF) o con una segunda sialiltransferasa que forma Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc (disialil-TF), todas las cuales no se unen al JAA-F11 de ratón, el quimérico o el humanizado. Por tanto, no se espera una unión tisular normal para los constructos JAA-F11 o hJAA-F11.

Análisis de afinidad relativa

Las afinidades de unión relativas de los cuatro anticuerpos hJAA-F11 y quiméricos a TF-Ag se determinaron al comparar la capacidad del anticuerpo de ratón para competir con los anticuerpos humanizados en un inmunoensayo enzimático. En este ensayo, los 3 μ g de cada Ab humanizado se mezclan con diluciones seriadas del anticuerpo anti TF-Ag de ratón (mJAA-F11). La unión del anti-TF-Ag humano a la placa recubierta con TF-Ag se mide mediante el uso de una IgG específica de especie anti-humana. La cantidad de mJAA-F11 de ratón requerida para inhibir 1 μ g de hJAA-F11 al 50 % se extrapola y se toma como una medida de afinidad relativa. Cuanto mayor sea la cantidad de anticuerpo de ratón necesaria para la inhibición, mayor será la afinidad relativa del anticuerpo.

Los resultados se resumen en la figura 3 y las tablas 2 y 3. La tabla 2 muestra la concentración inhibidora media máxima de JAA-F11 de ratón requerida (IC₅₀) por los diferentes anticuerpos para competir con 1 μ g de este anticuerpo humanizado. H2L2 se muestra con la mayor afinidad relativa por TF-Ag entre los anticuerpos, con una IC₅₀ de 2,31 μ g de anticuerpo de ratón. La tabla 7 muestra los valores p calculados para cada anticuerpo entre sí ANOVA - Prueba post-hoc de Tukey. Puede verse que esta diferencia de afinidad mejorada del anticuerpo H2L2 es estadísticamente significativa ($p < 0,05$), cuando se compara con cada uno del hJAA-F11 y el anticuerpo quimérico, excepto para H2L3 donde se acercó a la significancia ($p = 0,057$) (**tabla 3**). H2L3 no es significativamente diferente de H1L1, H2L2, H3L3 y del anticuerpo quimérico. Las afinidades relativas de H1L1, H3L3 y el anticuerpo quimérico no son significativamente diferentes entre sí.

Tabla 2. Afinidad relativa de anticuerpos hJAA-F11 y quiméricos JAA-F11 por TF-Ag.

IC ₅₀ , afinidad relativa por TF-Ag: μ g de mJAA-F11 requerido para la inhibición del 50 % de 1 μ g de cada hJAA-F11 o quimérico				
H1L1	H2L2	H2L3	H3L3	Quimérico
1,11 \pm 0,18 ^a	2,31 \pm 0,20	1,64 \pm 0,39 ^a	1,28 \pm 0,41 ^a	1,14 \pm 0,30 ^a
^a Se muestra el promedio de tres experimentos independientes \pm 1 DE.				

Tabla 3. El análisis ANOVA se realizó en réplicas del ensayo de IC₅₀ para comparar las diferencias entre el IC₅₀ de los diferentes anticuerpos. $P < 0,05$ significativo (sombreado).

Valor de p (Tukey)	H2L2	H2L3	H3L3	H1L1
H2L2		0,057	0,002	0,00
H2L3	0,057		0,330	0,071
H3L3	0,002	0,33		0,908
H1L1	0,00	0,071	0,908	
Quimérico	0,00	0,093	0,948	1,00

Análisis de reactividad biológica, especificidad y actividad de hJAA-F11

Los anticuerpos 3hJAA-F11 y JAA-F11 quimérico se unen a líneas celulares tumorales humanas.

Se evaluó la unión de hJAA-F11 y anticuerpos quiméricos JAA-F11 a diversas líneas celulares de tumores de mama humanos mediante el uso de ELISA de células completas. La línea celular 4T1 de tumor mamario de ratón positivo a TF-Ag sirvió como control positivo mientras que la línea celular de mieloma P3-X63-Ag8 sirvió como control negativo a TF-Ag. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes y se ensayaron de 3 a 4 líneas celulares a la vez por cuádruplicado con las líneas celulares de control. Una línea celular se consideró positiva si la unión relativa debida a hJAA-F11 o JAA-F11 quimérico (a 50 µg/mL) era significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que la del mieloma de control negativo a TF-Ag. Los resultados se muestran en la figura 4.

Las líneas celulares cancerosas probadas consisten en los diferentes subgrupos de cánceres de mama, receptor de hormonas positivo o negativo, Her2 positivo o negativo y triple negativo. Las líneas celulares positivas al receptor de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés) y al receptor de progesterona (PR, por sus siglas en inglés) probadas fueron CAMA-1 y HCC-1428. Se probaron dos líneas celulares positivas para el receptor Her2/neu, HCC-1419 y AU-565. Las líneas celulares de cáncer de mama triple negativas (TNBC, por sus siglas en inglés) probadas fueron HCC-70, MDA-MB-231, MDA-MB-468, DU-4475 y BT-549. Una línea celular, MDA-kb2, expresa el receptor de andrógeno, pero es receptor de estrógeno negativo. Estas líneas celulares de cáncer de mama se han examinado previamente mediante el uso de JAA-F11 de ratón y todas fueron positivas para la expresión de TF-Ag. En esta divulgación, los resultados muestran que los anticuerpos hJAA-F11 y JAA-F11 quimérico se unen a las 10 líneas celulares de cáncer de mama examinadas, lo que confirma la expresión de TF-Ag en estas líneas celulares. Entre los diferentes subgrupos de cáncer de mama, actualmente no existe una terapia dirigida para tratar pacientes con TNBC. Los datos obtenidos indican un papel terapéutico de TF-Ag en el direccionamiento de TNBC agresivos y el uso de anticuerpos hJAA-F11 para tratar y aumentar la supervivencia de pacientes con cáncer de mama independientemente del estado del receptor. La tabla 4 resume los tipos de cánceres de mama y la expresión de TF-Ag de cada línea celular probada.

Tabla 4. Tabla de líneas celulares de cáncer de mama probadas en ELISA de células completas. La tabla muestra el receptor de hormonas, el receptor de Her2/neu y la expresión de TF-Ag. Triple negativo (negrita), ER/PR positivo (cursiva) y HER2 positivo (negrita y cursiva). MDA-kb2* es negativo para el receptor de estrógeno, pero expresa el receptor de andrógeno.

Línea celular	Receptor de estrógeno	Receptor de progesterona	Receptor de Her2/neu	Expresión de TF-Ag
HCC-70	-	-	-	+
BT-549	-	-	-	+
MDA-MB-231	-	-	-	+
MDA-MB-468	-	-	-	+
DU-4475	-	-	-	+
<i>C4M4-1</i>	+	+	-	+
<i>HCC-1428</i>	+	+	-	+
HCC-1419	-	-	+	+
AU 565	-	-	+	+
MDA-kb2*	-	-	-	+

JAA-F 11 humanizado inhibe la proliferación de células cancerosas *in vitro*.

Dado que se ha demostrado que algunos anticuerpos anti-TF-Ag provocan la proliferación de células tumorales, era importante determinar el efecto de los diferentes constructos sobre la proliferación celular. El ensayo MTT que mide la actividad metabólica se eligió como sustituto del ensayo proliferativo directo de timidina tritiada. El efecto de los anticuerpos JAA-F11 humanizados, quiméricos y de ratón sobre el crecimiento de células cancerosas en comparación con un control sin anticuerpo se determinó a 4 µg/mL de los anticuerpos mediante métodos conocidos. Los datos se muestran en la figura 5. El anticuerpo quimérico y los anticuerpos JAA-F11 humanizados excepto el H3L3 causaron una inhibición pequeña (~ 6-11 %) pero estadísticamente significativa del crecimiento de células tumorales. No se observó ninguna potenciación de la proliferación celular.

El JAA-F11 humanizado induce ADCC

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) se realizó en líneas celulares de tumores de mama humanos mediante el uso del ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96 (Promega, Madison, WI) basado en el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de acuerdo con técnicas estándar con las siguientes adaptaciones. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana frescas a partir de sangre total anticoagulada con EDTA para usar con el anticuerpo humanizado y células de cáncer de mama de ratón 4T1 en una relación de efector a diana de 100:1. La liberación de LDH se usó para cuantificar la citotoxicidad.

La figura 6A muestra la cantidad de ADCC facilitada por los anticuerpos de ratón, quimérico, H1L1 y H3L3 en comparación con líneas celulares humanas de cáncer de mama, BT 549. Los experimentos se repitieron más de tres

veces. En todos los experimentos, H2L2 y H3L3 mostraron significativamente ($p < 0,5$) más ADCC que el anticuerpo quimérico o de ratón en las líneas celulares humanas. Más del 20 % de las células diana BT549 y HCC70 portadoras de TF-Ag se lisaron con anticuerpo H2L2 y H3L3 a 200 µg/mL en una relación de efector a diana (E:T) de 100:1. Asimismo, en todos los experimentos en la línea celular 4T1 de ratón, aunque todos los anticuerpos probados indujeron menos del 10 % de ADCC, el anticuerpo H3L3 mostró significativamente ($p < 0,05$) más ADCC que el anticuerpo quimérico o el de ratón. Esto indica que actualmente el anticuerpo H2L2 y H3L3 es la mejor opción para la inmunoterapia. Por el contrario, el JAA-F11 de ratón no mostró capacidades de ADCC estadísticamente significativas en ninguna de las pruebas. Los resultados de ADCC a partir de tres donantes de PBMC individuales se muestran en las figuras 6B, 6C y 6D.

El JAA-F 11 humanizado no induce CDC

La capacidad de los anticuerpos hJAA-F11 y quiméricos para mediar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se determinó por el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) mediante el uso de células HCC-1428 de células de cáncer de mama humano como células diana. El control positivo de LDH proporcionado con el estuche de reactivos se usó como control positivo y mostró lisis. Los anticuerpos JAA-F11 de ratón, quiméricos, H1L1, H3L3, H2L3 no indujeron citotoxicidad dependiente del complemento ya que no se produjo lisis como se muestra en la figura 7.

El JAA-F11 humanizado se internaliza en células cancerosas

La internalización de JAA-F11 humanizado y quimérico en células de tumor de mama 4T1 se determinó mediante dos métodos, un inmunoensayo enzimático con unión a la superficie medida y comparada después de incubar las células a 4 °C o 37 °C, y un método de microscopía inmunofluorescente con LAMP-1 (proteína de membrana asociada a lisosomas, un marcador lisosomal) y tinción DAPI para la tinción nuclear. En el inmunoensayo enzimático, como se muestra en la figura 8, los anticuerpos de ratón, H2L2, quiméricos, H2L3 y H1L1 se internalizaron significativamente con valores p de 0,001, 0,002, 0,001, 0,002 y 0,014, respectivamente. Sin embargo, el anticuerpo H3L3 no mostró una internalización significativa ($p = 0,16$) y esto se esperaba ya que H3L3 mostró significativamente ($p < 0,05$) más ADCC que el JAA-F11 quimérico o el de ratón.

En experimentos inmunofluorescentes, de acuerdo con el inmunoensayo enzimático los anticuerpos de ratón, quiméricos, H2L2, H2L3 mostraron internalización y la colocalización con el LAMP-1 y H3L3 mostró tinción de membrana que no se internalizó. Estos datos confirmaron los obtenidos mediante el inmunoensayo enzimático de superficie. Cabría esperar que los anticuerpos que mostraron una mayor actividad de ADCC mostraran una internalización más baja, ya que la presencia de anticuerpos en la superficie celular es necesaria para la función de ADCC. Se han realizado ensayos de internalización en hJAA-F11, quimérico y mJAA-F11. H3L3 mostró acuerdo con esta expectativa, al tener bajas cantidades de internalización, pero relativamente alta ADCC. H1L1, H2L3, quimérico y mJAA-F11 mostraron internalización estadísticamente significativa y no realizaron bien la ADCC. Se observó un resultado inesperado para el anticuerpo H2L2 que indujo una alta ADCC similar a H3L3 pero mostró el mayor porcentaje de actividad de internalización en comparación con los anticuerpos quiméricos y otros anticuerpos humanizados.

El experimento de internalización inmunofluorescente se realizó inicialmente mediante el uso de 5 µg/mL de anticuerpo y se repitió mediante el uso de concentraciones de anticuerpo a 0,1 µg/mL, y los anticuerpos que se internalizaron lo hicieron incluso a esta baja concentración. Los datos anteriores indican que, debido al alto porcentaje de internalización, y la velocidad rápida de esta internalización, los constructos quiméricos, H2L2 y H2L3 tienen el potencial de usarse como conjugados anticuerpo-fármaco. Los datos de especificidad de glucano, internalización de afinidad relativa, ADCC y CDC se resumen en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Resumen de internalización, ADCC y especificidad de glicanos de JAA-F11 de ratón, humanizado y quimérico.

Variantes de JAA-F11	ADCC	CDC	Internalización	Mayor especificidad por TF-Ag	Rango de afinidad
Ratón	No	No	Sí	No	
Quimérico	No	No	Sí	No	3
H1L1	Sí	No	No	Sí	3
H2L2	Sí	No	Sí	Sí	1
H2L3	No	No	Sí	Sí	2
H3L3	Sí	No	No	No	3

Obtención de imágenes de MicroPET

La obtención de imágenes de MicroPET se realizó en serie en un ratón a cada uno de los cuales se inyectó con anticuerpo 124Yodo-hJAA-F11 H2L2 y con 124Yodo libre. La obtención de imágenes se realizó a las 24, 48, 72, 96,

168 y 192 horas. **La figura 9** muestra la vista coronal de un ratón inyectado con el anticuerpo 124Yodo-hJAA-F11 H2L2 en diferentes momentos, mientras que la figura 10 es de un ratón control inyectado con 124Yodo libre. Se observó la captación del anticuerpo radiomarcado por el tumor a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección. También se observó la captación del anticuerpo en el bazo a las 48 horas (figura 9). El ratón de control negativo que portaba el tumor 4T1 TF-Ag positivo, que recibió 124Yodo libre, solo mostró que no había localización en ningún órgano o tumor excepto en la tiroides durante todo el estudio (figura 10).

El JAA-F11 completamente murino tiene potencial para inmunoterapia humoral pasiva y terapia conjugada de fármacos en pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, como se ha demostrado que el uso de anticuerpos de ratón en humanos está limitado por el desarrollo de respuestas de anticuerpos humanos anti-murinos (HAMA, por sus siglas en inglés) y una vida media corta en pacientes, la humanización es deseable para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo JAA-F11 de ratón y también permite que permanezca en circulación durante más tiempo.

Se reconocerá a partir de la descripción anterior de los resultados que esta divulgación proporciona, entre otros aspectos, una descripción de un enfoque novedoso para la humanización del mAb JAA-F11 de ratón, y comparaciones y contrastes entre los anticuerpos JAA-F11 de ratón, quiméricos y humanizados. El mJAA-F11 se humanizó en parte mediante injerto de CDR. Como reconocerán los expertos en la técnica, tradicionalmente, la humanización mediante injerto de CDR usa un único marco aceptor de anticuerpo humano [Jones, y otros Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. 1986. Nature 321: 522-525]. Por tanto, las secuencias marco humanas se eligen entre los genes de la línea germinal humana existentes. Por el contrario, en la presente divulgación, se usaron tres enfoques nuevos y diferentes para seleccionar el marco del anticuerpo aceptor humano para las cadenas de región variable pesada y ligera JAAF11, lo que genera tres variantes de la cadena pesada (H1, H2, H3) y 3 variantes de la cadena ligera (L1, L2, L3). Como se discutió anteriormente, cualquiera de las 3 cadenas pesadas (VH) puede emparejarse con cualquiera de las 3 cadenas ligeras (VL) para crear un total de 9 posibles variantes de combinación de hJAA-F11 VH/VL. También se generó un JAA-F11 quimérico que tiene la región variable de ratón completa y regiones constantes humanas de IgG1 y kappa, y se usó como control.

Una preocupación era si el enfoque usado para definir las regiones CDR y FR reduciría la inmunogenicidad de los anticuerpos humanizados. El método de puntuación T20 desarrollado por Gao y otros [Monoclonal antibody humanness score and its applications. 2013. BMC Biotechnology, 13:55], y validado con el análisis de 90 anticuerpos que se han utilizado en pacientes, se usó para predecir la inmunogenicidad de las variantes JAA-F11 humanizadas. Las puntuaciones T20 de las variantes de JAA-F11 humanizadas son todas más altas (mejoradas) (>85) que las del JAA-F11 quimérico (<85), lo que indica que la humanización de cadenas variables pesadas y ligeras mediante los tres métodos presentes creó variantes de hJAA-F11 que serán menos inmunogénicas que la variante quimérica.

Humanizamos el JAA-F11 de ratón y se han producido cinco anticuerpos mediante el uso de células CHO-K1, una quimérica y 4 constructos de hJAA-F11, H1L1, H2L2, H3L3 y H2L3. Por tanto, dado el beneficio de la presente divulgación, el experto en la materia podría hacer cualquier uso de las otras cuatro posibles combinaciones VH y VL.

La humanización del anticuerpo por injerto de CDR puede causar una disminución en la afinidad o pérdida de la unión al antígeno, lo que puede deberse a que la conformación de las CDR y el sitio de unión al antígeno se ven afectados negativamente por cambios en algunos residuos de aminoácidos del marco en el anticuerpo humanizado. Las CDR están hechas por residuos que interactúan con las regiones marco y otras CDR. Además de la interacción de los aminoácidos de CDR con los aminoácidos secuencialmente cercanos, algunos residuos del marco que pueden afectar la unión del antígeno directa o indirectamente incluyen los residuos de la zona Vernier y los residuos en la interfaz VL/VH. Los residuos de la zona Vernier son residuos en el marco de la hoja β subyacente a las CDR que proporcionan una base para la conformación de las estructuras de lazo. Los residuos de Vernier en la cadena ligera están en la posición 2, 4, 35, 36, 46, 48, 49, 64, 67, 69 y 71, mientras que en la cadena pesada se identifican en la posición 2, 27, 28, 29, 30, 47, 48, 49, 67, 69, 71, 73, 78, 93, 94 y 103. Los residuos en la interfaz VL/VH se han identificado por Chothia y colaboradores [Chothia C, y otros The packing of variable domains. 1989. J. Mol. Biol. 186:651-63], y están en la posición 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 y 98 de la cadena ligera, y en la posición 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100-100K y 103 para la cadena pesada.

Demostramos que los enfoques usados en esta divulgación para seleccionar las FR y CDR humanas no alteraron negativamente la afinidad del JAA-F11 humanizado por el TF-Ag, en relación con el JAA-F11 quimérico y de ratón. Al definir las CDR, se incluyeron residuos dentro de 5 Å a 6 Å del sitio de unión para asegurar que se mantiene la afinidad y especificidad por TF-Ag. Estos residuos están en la posición H31, H32, H33, H35, H50, H52, H53, H54, H95, H96, H97, H98 y H100 en la cadena pesada y en las posiciones L27d, L28, L30, L32, L34, L50, L89, L91, L92 y L96 en la cadena ligera. Sin embargo, a partir de los estudios de afinidad relativa, mientras que todos los anticuerpos humanizados mantienen la afinidad por el TF-Ag, observamos diferencias en la afinidad entre los anticuerpos. Los estudios de afinidad relativa revelaron que el anticuerpo H2L2 tiene la mayor afinidad de anticuerpo, seguido del anticuerpo H2L3. El anticuerpo H2L2 tiene la mayor afinidad relativa por TF-Ag entre los anticuerpos, y requiere más de 2 mg de anticuerpo de ratón para la inhibición de 1 mg de anticuerpo H2L2. El

anticuerpo H2L3 también tuvo una mayor afinidad que H1L1 y el anticuerpo quimérico, aunque no significativamente, mientras que las afinidades relativas de H1L1, H3L3 y el anticuerpo quimérico por TF-Ag no son significativamente diferentes entre sí.

- 5 Estas mejoras en la afinidad se pueden atribuir a los cambios en algunos residuos entre las diferentes variantes humanizadas. Las diferencias entre las variantes se enumeran a continuación en la tabla 6 y 6B.

Tabla 6A. Diferencias entre las secuencias de la variable pesada H1 H2 H3 y de ratón.

POSICIÓN	H1	H2	H3	Ratón
5	Valina	Leucina	Valina	Leucina
11	Valina	Leucina	Valina	Leucina
38*	Arginina	Arginina	Lisina	Lisina
48***	Metionina	Metionina	Isoleucina	Isoleucina
66*	Arginina	Arginina	Lisina	Lisina
67***	Valina	Valina	Alanina	Alanina
69***	Metionina	Leucina	Metionina	Leucina
73**	Treonina	Lisina	Treonina	Lisina
75	Isoleucina	Serina	Isoleucina	Serina
82b	Arginina	Serina	Arginina	Serina
83	Arginina	Treonina	Arginina	Treonina
85	Aspartato	Glutamato	Aspartato	Glutamato
108*	Leucina	Treonina	Treonina	Treonina
109*	Valina	Valina	Leucina	Leucina
12	Lisina	Lisina	Lisina	Alanina
20	Valina	Valina	Valina	Metionina
40	Alanina	Alanina	Alanina	Arginina
76	Serina	Serina	Serina	Treonina
81	Glutamato	Glutamato	Glutamato	Glutamina

** indica la posición de la zona Vernier.
 * indica que esta posición está dentro de los 4 aminoácidos de nuestra CDR modificada.

Tabla 6B. Diferencias entre las secuencias variable ligera L1, L2, L3 y de ratón

POSICIÓN	L1	L2	L3	Ratón
1	Aspartato	Aspartato	Aspartato	Ácido glutámico
2 **	Valina	Valina	Valina	Leucina
7	Serina	Treonina	Serina	Treonina
14	Treonina	Treonina	Treonina	Asparagina
17	Glutamina	Glutamina	Glutamina	Ácido aspártico
18	Prolina	Prolina	Prolina	Glutamina
36***	Fenilalanina	Fenilalanina	Tirosina	Tirosina
37*	Glutamina	Glutamina	Leucina	Leucina
39*	Arginina	Arginina	Arginina	Lisina
45	Arginina	Arginina	Arginina	Lisina
81	Ácido glutámico	Ácido glutámico	Ácido glutámico	Ácido aspártico
83	Valina	Valina	Valina	Leucina

** indica la posición de la zona Vernier.
 * indica que esta posición está dentro de los 4 aminoácidos de nuestra CDR modificada.

Como se mencionó anteriormente, los residuos del marco que afectan la unión del antígeno incluyen los residuos de la zona de Vernier y de la interfaz VL/VH. Cuando se comparan los constructos humanizados, los mAb de esta divulgación retienen la mayoría de los residuos de la zona de Vernier y de la interfaz VL/VH que pueden ser importantes para la conformación del sitio de unión, sin embargo, se hicieron algunos cambios para crear las variantes humanizadas menos inmunogénicas. Los aminoácidos que se cambiaron que estaban en la zona Vernier o en la interfaz VH/VL, y los cambios que se han hecho a los aminoácidos dentro de los 4 aminoácidos (secuencialmente) de las CDR, son los indicados por los asteriscos. Hay cuatro posiciones de la zona Vernier en la secuencia de la cadena pesada que difieren entre los tres constructos, posiciones 48, 67, 69 y 73. H2 retiene residuos de ratón, pero difiere entre los constructos H1 y H3 en ocho posiciones 5, 11, 69, 73, 75, 82b, 83 y 85. De estos ocho residuos, dos son residuos de la zona Vernier, en las posiciones 69 y 73. Al mismo tiempo, H2 y H1 tienen sustituciones en dos posiciones de la zona Vernier, es decir, en los residuos 48 y 67, que se mantienen como residuos de ratón en H3. Dado que no hay diferencia en la afinidad entre H1L1 y H3L3, esto sugiere que las posiciones de la zona Vernier en 48 y 67 probablemente no contribuyan a la diferencia de afinidad ya que se mantienen en H3, pero cambian en H1. H2, sin embargo, retiene los residuos de la zona Vernier del ratón en las

posiciones 69 y 73, a diferencia de H1 y H3, lo que sugiere que los cambios en estas dos posiciones de la zona Vernier pueden contribuir a las diferencias en la afinidad. Estos dos residuos de la zona Vernier que subyacen a la CDR2 pueden tener una unión de H2 potenciada en comparación con H1 y H3. De los aminoácidos diferentes entre los constructos humanizados, las posiciones 69 y 108 son las más cercanas al sitio de unión. El aminoácido en la posición 69 en H2 (como en el anticuerpo de ratón) es leucina, mientras que los otros dos constructos humanizados tienen metionina. De las diferencias entre H2 y el anticuerpo de ratón, los cambios en los aminoácidos 38, 48, 66, 67 y 109 son los más cercanos a las CDR y también pueden afectar la afinidad.

Dado que H2L2 tiene una mayor afinidad que H2L3, la comparación de L2 y L3 puede ayudar a delinear aún más la razón de esta diferencia. No hubo cambios para los residuos VL/VH y la mayoría de los residuos de la zona Vernier en la cadena ligera se mantuvieron entre los 3 constructos humanizados, excepto para las posiciones de Vernier 2 y 36. A diferencia de L3, pero como el anticuerpo de ratón, la L2 de mayor afinidad tiene una Fenilalanina en lugar de Tirosina en la posición de Vernier 36. Los aminoácidos en las posiciones 36 y 37 pueden influir en la conformación de una manera favorable, ya que están dentro de los 5 Å del sitio de unión y son parte de los aminoácidos en las posiciones 24-35 que se encontraron ser importantes en el mantenimiento del requisito de enlace alfa en el extremo reductor de GalNAc.

Muchos tejidos normales tienen estructuras no idénticas pero muy similares al TF-Ag, tales como las estructuras unidas a Galβ1-3GalNAc-beta que normalmente se encuentran en el sistema nervioso central, en las células NK y en el tejido nervioso periférico, por lo que el mantenimiento de la especificidad fina es la característica clave en esta humanización. El hJAA-F11 H1L1, H2L2, H3L3 y el anticuerpo quimérico retuvieron la misma o mejor especificidad fina de unión al antígeno en comparación con el anticuerpo de ratón, incluida la limitación de la unión a las estructuras unidas a Galβ1-3GalNAc-α (TF-Ag), y la falta de unión con estructuras α2-3 sialiladas en base a la matriz de glicanos. La especificidad de los constructos JAA-F11 humanizados parece ser la misma o incluso mejorada cuando se probaron contra más de 600 sacáridos diferentes. El JAA-F11 de ratón y todos los constructos humanizados reaccionan con solo 5 sacáridos, TF-Ag y 3 trisacáridos con un azúcar adicional unidos 1-6 a GlcNAc (NeuAc en 2 y GlcNAc en el 3ro) o con uno con 2 azúcares adicionales GalGlcNAc unidos 1-6 a GalNAc. Por ejemplo, H2L3 mostró menos unión en los otros 4 sacáridos que se unen a JAA-F11, mientras que H1L1 y H2L2 no tienen unión al tetrasacárido que se une a JAA-F11, en comparación con los anticuerpos quiméricos y de ratón. Aunque no se sabe que estos otros 4 sacáridos que se unen a JAA-F11 se expresen en tejidos normales, siempre es deseable una mayor especificidad por la estructura diana. Esto demuestra la probable capacidad de direccionamiento de todos estos anticuerpos en la terapia humana. Dado que H2L3 tiene una mayor especificidad de unión, como se muestra por una menor unión a 3 de los 4 sacáridos en comparación con los otros constructos, la diferencia entre H2 y H3 puede haber causado esta diferencia. Las diferencias entre variantes que ya se han discutido en la sección de afinidad pueden haber sido la razón de esta especificidad mejorada. H2L3 difiere de H2L2 en su menor unión a NeuAcalpha2-6 (TF-Ag) y GlcNAcbeta2-6 (TF-Ag).

Sin la intención de estar limitado por la teoría, se cree que la razón por la que H1L1 y H2L2 no se unen en absoluto al tetrasacárido puede tener que ver con una diferencia compartida entre estos anticuerpos en comparación con los anticuerpos H3L3 y de ratón. H1 y H2 tienen ambos una metionina en la posición 48, que es una posición de la zona Vernier y está secuencialmente dentro de los 4 aminoácidos de la CDR. Esta metionina es en lugar de la isoleucina del ratón y los anticuerpos H3.

En la presente divulgación, los resultados del EIA de células completas destacan la capacidad de los anticuerpos hJAA-F11 y JAA-F11 quimérico para unirse a líneas celulares de cáncer de mama triple negativas. Los datos obtenidos sugieren un papel terapéutico potencial de TF-Ag en la selección de todos los cánceres de mama, pero especialmente en los cánceres de mama triple negativos agresivos (TNBC), ya que no existen terapias dirigidas para estos tipos de cánceres en la actualidad.

Algunas lectinas y anticuerpos que se unen a TF-Ag provocan una mayor proliferación de células tumorales que expresan TF-Ag. Se cree que esto generalmente está relacionado con si la lectina o el anticuerpo se une a los anómeros alfa y beta en el extremo reductor (que causa la proliferación) o solo al anómero alfa (inhibitorio). Aunque JAA-F11 de ratón solo se une al anómero alfa y no provocó la proliferación de células tumorales, es importante determinar si los constructos humanizados tuvieron este efecto sobre las células tumorales. Los anticuerpos JAA-F11 humanizados y quiméricos no causan la proliferación de células cancerosas *in vitro*, por el contrario, similar al efecto del JAA-F11 de ratón, se observó una inhibición pequeña (~6 - 11 %) pero significativa del crecimiento de células cancerosas de 4T1 de ratón y humanas.

Como la ADCC es uno de los principales mecanismos por los que los anticuerpos eliminan las células tumorales, y es importante para que un anticuerpo se utilice para la terapia del cáncer, se examinó la capacidad de las variantes de JAA-F11 humanizadas para inducir la ADCC. Se observó actividad de ADCC con algunos, pero no con todos los constructos humanizados, y se observó con PBMC de tres individuos. Tanto el anticuerpo H2L2 como el H3L3 indujeron significativamente más ADCC que el anticuerpo quimérico o de ratón de las líneas celulares de cáncer de mama 4T1 de ratón y humanas, lo que indica que actualmente el anticuerpo H2L2 y H3L3 pueden ser las opciones preferidas para la inmunoterapia directa pasiva. El JAA-F11 de ratón no mostró ninguna capacidad ADCC estadísticamente significativa en ninguna de las pruebas. Otra función efectora que usan los anticuerpos para matar

las células tumorales es la CDC. Ninguno de los anticuerpos JAA-F11 humanizados, quiméricos y de ratón indujo CDC, pero esta falta de actividad de CDC no excluye su uso como inmunoterapéutico; de hecho, se ha encontrado que la Herceptin induce solo una cantidad nominal de CDC, y esta no es una de sus modos de acción. Los datos con Rituxan realmente muestran que la unión del complemento inhibe la unión de las células NK y disminuye la eficacia.

Los anticuerpos pueden usarse potencialmente para transportar fármacos o toxinas en forma de conjugados anticuerpo-fármaco al interior de la célula. Por lo tanto, evaluamos la capacidad de las variantes de JAA-F11 humanizadas para internalizar después de unirse al TF-Ag en células cancerosas. Se había demostrado previamente que el JAA-F11 de ratón se internalizaba en 1 hora. Mediante el uso de un inmunoensayo enzimático, mostramos que los anticuerpos de ratón, H2L2, quiméricos, H2L3 y H1L1 se internalizan significativamente en las células de cáncer de mama 4T1 de ratón, mientras que el anticuerpo H3L3 no mostró una internalización significativa. Un método de microscopía fluorescente de células vivas confirmó los resultados obtenidos del inmunoensayo enzimático. Esperábamos que los anticuerpos que mostraban una mayor actividad de ADCC mostrarán una internalización más baja y los resultados de ambos ensayos de internalización muestran concordancia con esta expectativa en que el anticuerpo H3L3 exhibió más ADCC que los anticuerpos de ratón o quiméricos, pero no se internalizó mucho. Sin embargo, H2L2, a pesar de que funcionó bien en el ensayo ADCC, se internaliza bien. El mecanismo de cómo ambos pueden ocurrir con el mismo anticuerpo aún no se comprende, pero una posibilidad es que diferentes tasas de producción en las células CHO pueden resultar en diferentes tasas de fucosilación, por lo que, si H2L2 está menos fucosilado, puede funcionar mejor en ADCC durante el tiempo que permanece en la superficie celular, aunque esté internalizado. Estos resultados muestran que los constructos quiméricos, H2L2 y H2L3 tienen el potencial de usarse como conjugados anticuerpo-fármaco.

Se ha demostrado que el anticuerpo 124I-JAA-F11 de ratón se localiza en tumores de mama TF-Ag en ratones. El anticuerpo JAA-F11 marcado permaneció unido al tumor 4T1 durante al menos 20 días y 24 días para un tumor de mama humano triple negativo, lo que implica que JAA-F11 podría usarse para encontrar metástasis y tratar el tumor portador de TF-Ag. Para probar si el anticuerpo humanizado marcado con yodo-124 localizará a los tumores de mama humanos en ratones, se utilizó el anticuerpo humanizado con la mayor afinidad, variante H2L2 (que internaliza y realiza la ADCC). La obtención de imágenes mostró una captación tumoral preferencial, con captación en la tiroides y en el bazo que se bloqueó en un experimento posterior con inmunoglobulina fría de conejo. La obtención de imágenes de MicroPET mostraron que el anticuerpo humanizado radiomarcado fue captado por el tumor en 24 horas y pudo verse hasta las 96 horas. Tal radiolocalización en pacientes podría usarse para encontrar metástasis y también usarse para determinar si existe alguna unión fuera de la diana en un paciente particular antes de la inmunoterapia pasiva directa o de la terapia conjugada anticuerpo-fármaco.

El antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF-Ag) está presente en más del 80 % de varios carcinomas humanos, incluidos los cánceres de mama. Tiene un papel funcional en la adhesión y metástasis tumorales, por lo que la capacidad de un anticuerpo para dirigirse al TF-Ag sugiere un posible uso como inmunoterapéutico, como un conjugado anticuerpo-fármaco para matar las células cancerosas y para inhibir la metástasis. El anticuerpo JAA-F11 con su alta especificidad única por el TF-Ag tiene un gran potencial como respuesta pasiva anti TF-Ag para el tratamiento de cáncer de mama y otros cánceres. En nuestro enfoque de humanización, hemos mantenido esta especificidad única y probablemente la hemos potenciado con las variantes de JAA-F11 humanizadas.

Ejemplo 2

Este ejemplo proporciona una descripción de los materiales y métodos usados para obtener los resultados descritos en la presente descripción.

El mAb H2aL2a se establece en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas.

Las CDR de JAA-F11 se predijeron previamente. Realizamos la clonación y secuenciación del anticuerpo JAA-F11 de ratón para confirmar las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Para tener beneficios terapéuticos en humanos, un anticuerpo debe mantener su especificidad por su antígeno diana y al mismo tiempo no generar reacciones inmunes anti-ratón. Seleccionamos el enfoque de injerto de CDR para retener las CDR del JAA-F11 de ratón a fin de mantener la especificidad y afinidad por TF-Ag. Las CDR se seleccionaron mediante el uso de los métodos de Chothia y Kabat, así como también la estructura cristalina de rayos X y el enroscamiento computacional de carbohidratos.

Para elegir un marco del anticuerpo aceptor humano para cada cadena de la región variable de JAA-F11 pesada y ligera, se realizó una búsqueda de Protein BLAST® (BLASTP) en la base de datos GenBank [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins against the entire non-redundant human \(Homo sapiens\)](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins%20against%20the%20entire%20non-redundant%20human%20(Homo%20sapiens)) para identificar los anticuerpos humanos más homólogos al JAA-F11 de ratón. Todas las secuencias de proteínas que no son de Homo sapiens, los anticuerpos humanizados y las secuencias de presentación en fagos se eliminaron de los resultados de BLASTP. Las diez secuencias más homólogas principales resultantes para cada secuencia de cadena

variable pesada y ligera de JAA-F11 se seleccionaron como marcos del anticuerpo aceptor humano potencial para JAA-F11 humanizado (hJAA-F11). El programa SeaView Sequence Alignment se usó para alinear las diez secuencias de marcos pesados o ligeros variables aceptores humanos potenciales con secuencias de regiones pesadas o ligeras variables de JAA-F11 de ratón.

Se construyeron tres regiones variables pesadas (H1, H2 y H3) y tres ligeras (L1, L2 y L3) a partir de la selección de proteína BLAST de las 10 secuencias de inmunoglobulina humana más similares. Las CDR finales de JAA-F11 de ratón se injertaron luego por uno de tres métodos diferentes, lo que crea 3 cadenas pesadas diferentes y 3 cadenas ligeras diferentes. En el primer método de regiones marco humanas, (a) Las secuencias de FR Pesada H1 y Ligera L1 se diseñaron para contener el aminoácido humano que se presenta con más frecuencia en cada sitio entre las diez secuencias de FR humanas principales seleccionadas. En el segundo método, (b) La Pesada H2 y Ligera L2 se diseñaron para contener el aminoácido humano que se presenta con más frecuencia entre las diez secuencias principales de FR humanas seleccionadas en cada sitio, a menos que un aminoácido estuviera presente en cualquiera de las diez principales FR humanas principales que coincidió con el observado en el JAA-F11 de ratón, entonces el aminoácido se mantuvo como en el JAA-F11 de ratón. En el tercer método, (c) En Pesada H3 o Ligera L3, los tres residuos FR antes y después de las CDR1, CDR2 y CD3 de JAA-F11 de ratón se mantuvieron y el resto de los residuos fueron los aminoácidos más frecuentes en las secuencias humanas como en las variantes H1 o L1. Cualquiera de estas cadenas variables pesadas diseñadas puede emparejarse con cualquiera de las cadenas variables ligeras diseñadas de manera similar, por ejemplo, H1/L1, H1/L2, H1L3, H2L1, H2L3, etc.

También se construyó un JAA-F11 quimérico en el que la región variable de JAA-F11 de ratón completa se unió a una región constante de IgG1 humana. Esto es para proporcionar una línea de base que debe tener la especificidad y afinidad originales del anticuerpo de ratón mientras que tiene la región constante humana, que será usada como control positivo para evaluar las variantes humanizadas.

Evaluación de modelos de hJAA-F11

Se evaluaron diversos constructos de hJAA-F11 para determinar los efectos conformacionales. Brevemente, las secuencias de cadenas variables pesadas y ligeras propuestas de diversos constructos de hJAA-F11 se alinearon con la secuencia de JAA-F11. Cualquier residuo de aminoácido en el marco para cada variante humanizada que podría causar potencialmente una interacción estérica grave con los aminoácidos circundantes se eliminó y se reemplazó con el residuo del marco de JAA-F11 de ratón original.

Predicción de inmunogenicidad de variantes de hJAA-F11 mediante el uso de puntuación T20.

Aunque los anticuerpos humanizados o completamente humanos se consideran no inmunogénicos y seguros para uso humano, se ha informado de inmunogenicidad de anticuerpos completamente humanos y humanizados en pacientes. Para determinar si las secuencias seleccionadas eran de baja inmunogenicidad, se realizó un análisis de inmunogenicidad mediante el método de puntuación T20. El analizador de puntuación T20, desarrollado por Gao y otros, calcula la "humanidad" de las secuencias de la región variable del anticuerpo monoclonal mediante el uso de una base de datos de más de 38 000 secuencias de anticuerpos humanos.

En este método, se realiza una búsqueda proteína BLAST y el Ab humanizado de prueba se compara primero con todas estas secuencias humanas. A continuación, el anticuerpo humanizado se compara con las 20 primeras coincidencias de BLAST de Ab humano y se puntúa por similitud con estas secuencias. La puntuación T20 para el anticuerpo humanizado se obtiene a partir del promedio de las identidades porcentuales de las 20 secuencias humanas coincidentes principales. La puntuación más alta posible es 100 (más parecida a la humana). Como prueba de concepto de la relación de este método con la inmunogenicidad en el paciente, Gao y otros compararon los resultados de inmunogenicidad *in vivo* en el paciente de más de 90 anticuerpos que están aprobados para uso clínico o en diversas etapas de desarrollo clínico (ratón, quimérico (de ratón), humanizado (n=22) y secuencias de anticuerpos completamente humanas) con la puntuación T20, y encontró que los Ab con puntuaciones T20 de secuencias de FR y CDR superiores a 80 no eran inmunogénicos, y mediante el uso de puntuaciones T20 para las secuencias de FR solamente, aquellos por encima de 85 no eran inmunogénicos. Las puntuaciones T20 para las variantes de JAA-F11 humanizadas se calcularon mediante el uso de T20 Cutoff Human Databases en abanalyzer.lakepharma.com/.

Optimización de codones y síntesis de genes. Después del diseño de las secuencias de aminoácidos de las variantes VH y VL de JAA-F11 humanizadas, las secuencias de nucleótidos correspondientes se seleccionaron manualmente para el uso de codones óptimos para la producción de proteína celular de *Cricetulus griseus* (CHO) y se sintetizaron e insertaron en el plásmido pUC57, un vector de clonación de uso común.

Subclonación y secuenciación de genes de variables pesados (VH) y ligeros (VL) de hJAA-F11 y JAA-F11 quimérico en vectores de expresión de mamíferos. Los genes de hJAA-F11 VH se subclonaron y se insertaron en un vector de expresión (pAH6307) que contenía una región líder/constante de la cadena pesada de IgG1 humana bajo el control de casetes del promotor del citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés) humano y ampicilina (Amp) e histidinol deshidrogenasa (hisD). Los genes VL se insertaron en un vector de expresión (pAN 6714) que contenía una región

líder/constante de la cadena ligera kappa humana bajo el control del casete del promotor de CMV humano y de neomicina fosfotransferasa (neoR). De manera similar, las VH y VL de JAA-F11 quiméricos se expresaron y usaron como control positivo en análisis posteriores.

5 Expresión y producción de variantes de JAA-F11 humanizadas y quiméricas.

Co-transfección en células CHO-K1.

Se cultivaron células adherentes de ovario de hámster chino (CHO-K1; ATCC #CCL-61, Manassas, VA) durante 18 horas antes de la transfección en medio F12 de Ham (Corning Cellgro, Manassas, VA) suplementado con suero fetal de ternero al 10 % (FCS; Hyclone) a 37 °C y 5 % de dióxido de carbono (CO₂) en aire humidificado y se recolectaron al 50-80 % de confluencia. Los vectores de expresión de mamíferos 6307 pAH (VH) y 6714 pAN (VL) se cotransfectaron en células CHO-K1 mediante electroporación (Gene Pulser System (Bio-Rad, Hercules, CA)). Brevemente, cada plásmido (VH y VL) se linealizó mediante el uso de la enzima de restricción PvuI (Promega, Madison, WI) y se añadieron 5 µg de cada plásmido a 5 x 10⁶ células CHO-K1 en medio F12 de Ham frío (Corning Cellgro, Manassas, VA) en un volumen total de 500 µL en una cubeta de electroporación de 0,4 cm (Bio-Rad, Hercules, CA). La cubeta que contenía la mezcla se sometió a electroporación a 960 µF y 250 mV. A continuación, la mezcla de transfección se diluyó con medio no selectivo precalentado (F12 de Ham complementado con FCS al 10 %) hasta una concentración de 1 x 10⁵ células/mL. Entonces doscientos microlitros se sembraron en placa(s) de cultivo tisular de 96 pocillos (BD Bioscience, San José, California) a una densidad de 1 x 10⁴ células por pocillo. Las células transfectadas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ en una incubadora de cultivo de tejidos. A las 72 horas, se retiró el medio no selectivo de la placa de cultivo tisular de 96 pocillos y se reemplazó con 200 µL de medio selectivo F12 de Ham (más FCS al 10 %) que contenía 700 µg/mL de G418 (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY), 5 mM de histidinol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y 10 mM de tampón HEPES (Corning Cellgro, Manassas, VA) y las colonias se dejaron crecer hasta 3 semanas. Las células CHO-K1 transfectadas con los plásmidos 6307 pAH y 6714 pAN crecerán, mientras que las células CHO-K1 no transfectadas no crecerán. Cada 2-4 días durante los siguientes 14 a 21 días, se reemplazó el medio selectivo para eliminar los restos de células muertas y se permitió que las colonias de células resistentes crecieran en el medio selectivo.

30 Análisis de sobrenadantes de cultivos mediante inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

Entre 14 y 21 días después de la selección, se recolectaron los sobrenadantes del cultivo de CHO-K1 de la(s) placa(s) de 96 pocillos y se analizaron para detectar anticuerpos mediante inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Brevemente, se añadieron 100 µL de sobrenadantes de cultivo a placas de microtitulación de 96 pocillos de unión media Immulon 1 B (Thermo Scientific, Milford, MA) que se habían recubierto con 1,25 µg/mL de conjugado TF-Ag-BSA en el tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 0,1 M a pH 9,6) y se lavó cinco veces con TBS-brij (pH 7,2). Una dilución 1:500 de JAA-F11 de ratón purificado (1 mg/mL) en PBS estéril se añadió también en 2-3 pocillos de cada placa para servir como controles positivos. Después de una incubación de 2 horas a 37 °C, las placas se lavaron cinco veces y se añadieron 100 µL del anticuerpo secundario conjugado anti-IgG humana-fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en tampón BSA-PBST al 1 % (1:10 000) en cada pocillo para las células transfectadas, mientras que una dilución 1:1000 de un anticuerpo secundario conjugado anti-IgG de ratón-fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en tampón BSA-PBST al 1 % se usó para el pozo control de JAA-F11 de ratón. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron cinco veces y luego se añadieron a cada pocillo 100 µL de sustrato de fosfatasa (p-nitrofenilfosfato (pNPP)) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Las placas se leyeron a 405 nm mediante el uso de un lector de placas después de una hora de incubación a temperatura ambiente para detectar la presencia de anticuerpos IgG contra TF-Ag. Como blanco, se usó medio F12 de HAM (más FCS al 10 %) durante la incubación del anticuerpo primario, seguido de la incubación del anticuerpo secundario y la incubación del sustrato.

50 Generación de clones estables y producción

Después de la selección inicial para el anticuerpo anti-TF-Ag a los 14-21 días después de iniciada la selección, se seleccionaron 10-12 clones con las lecturas de absorbancia más altas y se transfirieron a placas de cultivo de tejido de 24 pocillos para su expansión. Los sobrenadantes de cultivo de estos clones se analizaron luego mediante ELISA. Los 4 clones que dieron las lecturas de absorbancia más altas se transfirieron a frascos de cultivo de tejidos T25, se expandieron y se seleccionaron nuevamente para anticuerpos anti-TF-Ag mediante ELISA para asegurar que los clones todavía producían anticuerpos reactivos a TF-Ag. Estos 4 clones se transfirieron luego a frascos de cultivo de tejidos T75, se expandieron, se volvieron a seleccionar para anticuerpos anti-TF-Ag y las células se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido. El clon con el resultado más alto de anti-TF-Ag se expandió más y se pasó 2 a 3 veces para asegurar que la línea celular sea estable.

Se generaron clones de células individuales estables para cada combinación de cadena ligera y pesada de hJAA-F11 del mejor clon obtenido anteriormente mediante subclonación por dilución limitante. Brevemente, las células se cultivaron hasta la confluencia en un frasco de cultivo de tejidos T75, se recolectaron y se contaron y se sembraron a una dilución de 0,3 células/pocillo en cada pocillo de placas de 96 pocillos en el medio selectivo. Las placas se examinaron cuidadosamente 7 - 10 días después bajo un microscopio y se marcaron y controlaron los pocillos que

mostraban un solo foco de células hasta que se observó suficiente densidad de crecimiento. Los sobrenadantes de estos pocillos marcados se probaron para anticuerpos anti-TF-Ag mediante ELISA. Los 4 clones que dieron las lecturas de absorbancia más altas se expandieron como se describió anteriormente para obtener los clones parentales. El subclon que rindió la mayor absorbancia se expandió y se utilizó para la producción de sobrenadante en Tripleflasks de cultivo celular T200 Nunc™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Para la producción en los frascos de cultivo Tripleflasks para cada variante de JAA-F11 humanizada, las células se cultivaron durante 3 semanas antes de recolectar 1 litro de sobrenadante de cultivo. El clon que produce el JAA-F11 quimérico se procesó de la misma manera que las variantes de JAA-F11 humanizadas.

Purificación de variantes de JAA-F11 humanizadas y quiméricas

Los sobrenadantes de las variantes de JAA-F11 humanizadas y quiméricas se purificaron mediante el uso de Protein A-Sepharose® 4B, columna de afinidad Fast Flow (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Para preparar la columna de Proteína A, se vertió en una columna una suspensión 1:1 de resina en Tampón A (NaH₂PO₄ 0,02 M, NaCl 0,15 M, pH a 8,0). Una vez que la columna se hubo asentado, se lavó con 20 volúmenes de columna (CV, por sus siglas en inglés) de tampón A. Se centrifugó un litro de sobrenadante de cultivo celular CHO-K1 a 3500 rpm durante 30 minutos para eliminar las células muertas o los restos y luego se filtró. El sobrenadante filtrado se cargó en la columna de Proteína A y se dejó gotear por gravedad a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Después, la columna se lavó con 10 CV de tampón A. El anticuerpo se eluyó de la columna de proteína A mediante el uso de 3 CV de tampón B (Na₂HPO₄ 0,2 M, ácido cítrico 0,1 M, pH 3,9). El eluato se neutralizó cuidadosamente con NaOH 0,1 M para minimizar el efecto del pH bajo sobre el anticuerpo. La columna de Proteína A se reequilibró con 20-30 CV de tampón A y se almacenó a 2-8 °C. Cada columna se utilizó hasta cinco veces para el mismo anticuerpo. El anticuerpo purificado se dializó durante la noche a 4 °C (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette; Thermo Scientific) contra cualquiera; IX solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) o medio RPMI con o sin rojo fenol, según se requiera para ensayos posteriores. Después de la diálisis, el anticuerpo se filtró con un filtro de 0,22 µm (Corning) y se determinó la concentración de proteína mediante un ensayo de proteína Bio-Rad como se detalla a continuación. El anticuerpo se almacenó a 4 °C y se comprobó su unión a TF-Ag mediante el uso de ELISA.

Ensayo de proteínas Bio-Rad

La concentración de anticuerpo se determinó mediante el uso del ensayo de proteínas Bio-Rad que se basa en el método de unión al colorante de Bradford. Brevemente, el reactivo colorante se diluyó con agua destilada en una relación de 1:4 y se filtró mediante el uso de papel de filtro Whatman #1. Se prepararon diluciones seriadas de un estándar proteico conocido (1,44 mg/mL de gammaglobulina, Bio-Rad, Hercules, CA) y la muestra de anticuerpo humanizado mediante el uso de tampón IX PBS. Se colocaron 10 µL de cada solución estándar y muestra por triplicado en los pocillos de una placa de microtitulación. A continuación, se añadieron doscientos microlitros del reactivo colorante diluido a todos los pocillos mediante el uso de una pipeta multicanal y se mezclaron minuciosamente al pipetear hacia arriba y hacia abajo sin crear burbujas. La placa se incubó a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos a 1 hora. Luego se leyó la absorbancia a 595 nm en el lector de placas (Bio-Tek Instruments).

Análisis de especificidad química y afinidad de anticuerpos JAA-F11 humanizados y quiméricos

Determinación de la especificidad química

La especificidad química de los diversos constructos de hJAA-F11 y el JAA-F11 quimérico se determinó mediante el uso de la matriz de glicanos impresa. Esto se comparó con los datos obtenidos previamente para el JAA-F11 de ratón. La matriz de glicanos es un método inmunofluorescente indirecto, descrito en el sitio web Consortium for Functional Glycomics. Se analizó la reactividad de cada constructo con 610 glicanos diferentes. Brevemente, la matriz impresa se incubó sucesivamente con el anticuerpo, se lavó y se incubó con el anticuerpo secundario marcado con FITC. Después del lavado, la imagen se leyó en un Perkin Elmer Microscanarray XL4000 y se almacenó una imagen de archivo tiff y se realizó un análisis de imagen mediante el uso del software de análisis de imágenes ImageJ V.6. La unión relativa de cada glicano de unión se expresó y normalizó con la unión del glicano TF-Ag original. La comparación y el análisis estadístico de las capacidades de unión relativas se realizaron mediante el uso de ANOVA.

Determinación de la afinidad relativa

La unión por afinidad relativa de hJAA-F11 a TF-Ag se analizó mediante el uso de un ELISA de inhibición competitivo con el anticuerpo JAA-F11 de ratón y el anticuerpo JAA-F11 quimérico. Brevemente, se incubaron 3 µg/mL de hJAA-F11 o JAA-F11 quimérico en presencia de diferentes concentraciones de JAA-F11 de ratón (10, 8, 6, 4, 2 µg/mL) en placas de 96 pocillos recubiertas con 1,25 µg/mL de TF-Ag (Thermo Scientific, Milford, MA). El anticuerpo unido se detectó mediante incubación con anticuerpo secundario anti-IgG humana y sustrato y se obtuvo la lectura de absorbancia como se describió en estos materiales y métodos. Se determinó y comparó la cantidad de anticuerpo de ratón necesaria para inhibir la unión de 3 µg/mL de anticuerpos humanizados o quiméricos en un 50

%. Cuanto mayor sea la cantidad de anticuerpo de ratón necesaria para la inhibición, mayor será la afinidad relativa del anticuerpo. La afinidad relativa de cada uno de los anticuerpos humanizados y el anticuerpo quimérico se comparó mediante el uso de ANOVA.

5 Análisis de eficacia biológica de hJAA-F11

Evaluación de la unión a líneas celulares de tumores de mama humanos

La unión de hJAA-F11 a diversas líneas celulares de tumores de mama humanos se analizó mediante el uso de ELISA de células completas. La línea celular 4T1 de tumor mamario de ratón portador de TF-Ag sirvió como control positivo mientras que la línea celular de mieloma P3-X63-Ag8 (ATCC Número: CRL-1580) que fue la pareja de fusión para producir el hibridoma JAA F11 sirvió como el control negativo del antígeno TF. La unión positiva se determinó al comparar la reactividad de cada anticuerpo con cada línea celular a la reactividad de ese anticuerpo con la línea celular de mieloma mediante el uso de la prueba T de Student. Para estandarizar los datos, se expresó la unión a cada línea celular al dividir la lectura de absorbancia de la línea celular de prueba por la lectura de absorbancia de las células de mieloma.

Preparación celular

Las líneas celulares de tumor de mama 4T1 y mieloma se recolectaron mediante el uso de un Cellstripper no enzimático (Mediatech, Inc. VA, EE.UU.). Para evitar la acumulación de células, medios, tampón y reactivos se precalentaron antes de usarlos. Para las células adherentes, se retiró el medio de los recipientes de cultivo y las células se enjuagaron con IX solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS, por sus siglas en inglés) sin calcio y magnesio (Mediatech Inc., Cellgro). Se añadieron cinco mililitros de solución de disociación celular a cada frasco y luego se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Se golpearon los frascos para desprender las células. Para las células de mieloma no adherentes, los frascos se golpearon bien y el sobrenadante del cultivo se centrifugó a 1000 x G durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en solución de disociación celular y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Después de la incubación, se añadieron 20 mL de IX DPBS a las células y se pipetearon repetidamente para eliminar los grumos. A continuación, las suspensiones celulares se centrifugaron a 1000 x G durante 10 minutos. Los sobrenadantes se decantaron y los sedimentos se resuspendieron en 5 mL de DPBS. Las células se contaron mediante el uso de tinción con azul tripán y un hemocitómetro. Las células se diluyeron para obtener 1×10^6 células viables/mL. Doscientos microlitros de las suspensiones celulares (2×10^5 células) se colocaron en tubos de poliestireno de 5 mL cuádruples. Se añadieron 200 microlitros de solución de formaldehído al 4 % a cada tubo y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de ser centrifugados a 1500 x G durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó cuidadosamente de una vez, las células se lavaron en DPBS seguido de centrifugación y decantación. Se añadieron doscientos microlitros de PBS-tween BSA al 1% (p/v) a cada tubo y se almacenaron a 4 °C durante la noche o hasta dos semanas.

Inmunoensayo enzimático en células

Se añadieron 200 microlitros de 50 µg/mL del anticuerpo JAA-F11, hJAA-F11 o JAA-F11 quimérico de ratón a tubos que contenían las diferentes líneas celulares probadas en cuádruple y se incubaron a 37 °C durante dos horas. Un conjunto de tubos tratados con 200 µL de IX PBS-Tween 20 al 0,1 %-BSA al 1 % sirvió como control negativo para cada línea celular probada. Los tubos se lavaron tres veces con 3 mL de tampón de lavado (IX PBS Tween, sin azida), luego se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 x G. El sobrenadante se decantó cuidadosamente entre cada lavado. Doscientos microlitros del anticuerpo secundario de anti-IgG de ratón (específico de cadena γ) peroxidasa de rábano picante (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o anticuerpo secundario de anti-IgG humano (específico de cadena γ) peroxidasa de rábano picante (1:2000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en PBS-Tween-BSA al 1 % se añadió a los tubos respectivos y luego se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después de la incubación, los tubos se decantaron y lavaron tres veces y se centrifugaron a 1500 x G entre lavados. A continuación, se añadieron a cada tubo doscientos microlitros de solución sustrato de diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD; por sus siglas en inglés, Sigma, St. Louis, MO) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, la reacción se detuvo mediante adición de 100 µL de solución de parada (H_2SO_4 1N) y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 x G. Luego, se retiraron 200 µL de sobrenadante de cada tubo y se transfirieron a los pocillos respectivos en una placa de microtitulación. Se leyó la absorbancia a 490 nm mediante el uso del lector de microplacas (Microplate Autoreader, Modelo EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.) y se usó sustrato OPD sin reaccionar como blanco. Para las diferentes líneas celulares, cada blanco promedio respectivo (tubos con solo PBS-Tween-1 % BSA) se dedujo de su DO promedio respectiva para obtener la lectura óptica final. Cada experimento se repitió 3 veces.

Efectos de hJAA-F11 sobre la proliferación de células cancerosas *in vitro*

Para examinar los efectos de los anticuerpos JAA-F11 humanizados y quiméricos sobre el crecimiento de células cancerosas, se realizaron análisis de proliferación con bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (azul de tiazolil, MTT) *in vitro*. Se sembraron células de tumor de mama 4T1 de ratón y células de tumor de mama humano a 1×10^4 células/pocillo en 10 réplicas en placas de 96 pocillos en presencia de cantidades variables de JAA-F11,

JAA-F11 humanizado y quimérico (4, 2 y 1 µg/mL). Cuando se ponen a esta densidad celular, las células están en la porción lineal de sus curvas de crecimiento a las 72 horas. Las células cultivadas en medio de cultivo sin anticuerpos sirvieron como controles de crecimiento normal. El medio de cultivo solo se usó como blanco. Después de 68 horas de crecimiento celular a 37 °C, se añadieron 10 µL de la sal de tetrazolio MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y las placas se devolvieron a la incubadora durante otras 4 horas. Al final de la incubación, el producto de formazán resultante en cada pocillo se solubilizó mediante la adición de 120 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific), y luego se midió la absorbancia de cada pocillo a 570 nm (MicroplateAutoreader, Modelo EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.).

Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

Para examinar las funciones efectoras de los anticuerpos hJAA-F11, se realizaron análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

La ADCC se determinó mediante el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96; Promega, Madison, WI) mediante el uso de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como células efectoras y líneas celulares de tumores de mama humanos como células diana en una relación de efector a diana (E:T) de 100:1.

Las PBMC se prepararon a partir de sangre total por centrifugación en gradiente de densidad mediante el uso de Ficoll-Paque. Se mezcló la sangre total recogida en recipientes al vacío con EDTA de tapa púrpura con un volumen igual de DPBS estéril precalentado. Luego, se colocaron suavemente en capas veinte mililitros de sangre diluida sobre 15 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) en tubos cónicos de 50 mL. Las muestras se centrifugaron a 1300 rpm durante 30-40 minutos a temperatura ambiente sin freno. A continuación, se colectó la capa de PBMC y se añadió PBS estéril a las PBMC para un volumen total de 40 mL. Luego, la mezcla se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos de 18 °C a 22 °C para eliminar cualquier Ficoll contaminante y plaquetas/proteínas plasmáticas. Se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en PBS estéril fresco y se repitió la etapa de centrifugación. Las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (FCS al 10 %) y se contaron mediante el uso de hemocitómetro y azul tripán.

Se añadieron las células diana (1 x 10⁴; 30 µL) y PBMC (1 x 10⁶; 30 µL) en placas de 96 pocillos con fondo en U y se incubaron con anticuerpos hJAA-F11 o quiméricos (200 µg/mL; 30 µL) durante 17 horas a 37 °C en una incubadora de cultivo de tejidos. Cuarenta y cinco minutos antes de completar las 17 horas de incubación, se añadieron 10 µL de solución de lisis (x10) a los pocillos que contenían el control de liberación máxima de LDH de la célula diana (células diana y medio) y el control de corrección de volumen (medio solo). Al final de la incubación, la placa se centrifugó durante 4 minutos a 1000 rpm. Después, se transfirieron alícuotas de cincuenta microlitros de todos los pocillos a una placa nueva de 96 pocillos de fondo plano. A continuación, se añadieron 50 µL de mezcla de sustrato reconstituido a cada uno de estos pocillos. La placa se cubrió con papel de aluminio y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con la adición de 50 µL de solución de parada a cada pocillo y se registró la absorbancia a 490 nm mediante el uso de un lector de microplacas (MicroplateAutoreader, Modelo EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.). La citotoxicidad se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = 100 \times [(E - SE)] / [(M - SE)],$$

donde para cada condición se mide la absorbancia del sustrato. Las condiciones son las siguientes; E es el pocillo experimental, SE es la liberación espontánea sin el control de anticuerpos (células diana incubadas con células efectoras y PBS), M es la liberación máxima determinada por las células diana lisadas con solución de lisis 10X.

Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

El CDC se determinó mediante el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96; Promega, Madison, WI) mediante el uso de células de tumor de mama HCC 1428 (ATCC® CRL-2327, Manassas, VA) como población de células diana. Como control positivo se usó una muestra positiva a LDH que contiene LDH de corazón bovino, proporcionada con el estuche de reactivos. Después de comparar el complemento de conejos, conejos bebés y conejillos de indias para los niveles de citotoxicidad de fondo, se usó suero de conejillo de indias liofilizado (CL3112, Cedarlane Laboratories, Burlington, NC) como fuente del complemento y se reconstituyó según las instrucciones del fabricante. La concentración celular óptima usada en el ensayo fue 1 x 10⁴ células/50 µL por pocillo. Los anticuerpos usados se dializaron contra medio RPMI libre de rojo fenol. Para los pocillos experimentales, 50 µL de suspensión celular de HCC 1428, 20 µL de dilución del complemento (dilución final a 1:20) y 30 µL de anticuerpo (concentración final a 100 µg/mL), se mezclaron en cada pocillo por cuadruplicado en grupos placa de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo. Se incluyeron pocillos de control que contenían células diana y complemento sin anticuerpo para controlar cualquier citotoxicidad mediada por el suero usado como fuente de complemento y la liberación espontánea de LDH. La placa se centrifugó a 1000 rpm durante 4 minutos y luego se incubó durante 2 horas a 37 °C con dióxido de carbono al 5 %. Cuarenta y cinco minutos antes de completar las 2 horas de incubación, se añadieron 10 µL de solución de lisis (x10) a los pocillos que contenían el control de liberación máxima de LDH de la célula diana y el control de corrección de volumen.

Al final de la incubación, la placa se centrifugó durante 4 minutos a 1000 rpm. Después, se transfirieron alícuotas de cincuenta microlitros de todos los pocillos a una placa nueva de 96 pocillos de fondo plano. A continuación, se añadieron 50 µL de mezcla de sustrato reconstituido a cada pocillo. La placa se cubrió con papel de aluminio y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con la adición de 50 µL de solución de parada a cada pocillo y se registró la absorbancia a 490 nm mediante el uso de un lector de microplacas (MicroplateAutoreader, Modelo EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.). La citotoxicidad se calculó mediante la fórmula:

$$\text{citotoxicidad (\%)} = 100 \times [(E - SE) / [(M - SE)],$$

donde para cada condición se mide la absorbancia del sustrato. Las condiciones son las siguientes; E es la absorbancia del pocillo experimental, SE es la liberación espontánea con complemento sin el anticuerpo (células diana incubadas con complemento y medio), y M es el de las células diana lisadas con solución de lisis 10X.

Ensayos de internalización celular

La internalización de JAA-F11 humanizado y quimérico en células de tumor de mama 4T1 se analizó mediante dos métodos, un inmunoensayo enzimático con unión a la superficie medida a 2 temperaturas de incubación, 4 °C y 37 °C, y un método de microscopía inmunofluorescente.

Método de internalización por inmunoensayo enzimático

Se probó la línea celular de cáncer de mama 4T1 de ratón para determinar la internalización de JAA-F11, hJAA-F11 o JAA-F11 quimérico. Se sembraron quinientas mil (5 x 10⁵) células en los seis pocillos de una placa de 6 pocillos y se cultivaron hasta la confluencia. Para cada anticuerpo probado, se prepararon dos placas. Se retiró el medio de cada placa y se añadió 1 mL de anticuerpo (200 µg/mL) a 3 pocillos de cada placa, y se añadió 1 mL de dilución de PBS a los 3 pocillos restantes. Un grupo de placas se incubó a 37 °C para permitir la internalización y la otra placa se incubó a 4 °C. Después de 1 hora de incubación, se retiró el medio y los pocillos se lavaron 4 veces con 1 mL de medio RPMI libre de rojo fenol. A continuación, se añadió 1 mL de paraformaldehído al 2 % a cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para fijar las células. Después, las placas se lavaron 4 veces con medio RPMI libre de rojo fenol. A continuación, se añadió un mL de anticuerpo secundario de anti-IgG de ratón o anti-IgG humana (específico de la cadena γ) fosfatasa alcalina (1:5000, Sigma, St. Louis, MO) en 1 % BSA/PBS y las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Luego, las placas se lavaron 4 veces con medio RPMI libre de rojo fenol y se añadió 1 mL de sustrato de p-nitrofenil fosfato (pNPP) y se incubaron durante 1 hora en la oscuridad. Después de 1 hora de incubación, se transfirieron 200 µL de cada pocillo a los respectivos pocillos de una placa de 96 pocillos y se registró la absorbancia a 405 nm mediante el uso de un lector de microplacas (MicroplateAutoreader, Modelo EL311, Bio-Tek Instruments, Inc.). El sustrato sin reaccionar se usó como blanco. Se promediaron los pocillos por triplicado, la densidad óptica media del blanco solo con medio se restó de los pocillos que contenían el anticuerpo. El porcentaje de internalización se calculó mediante el uso de la fórmula:

$$\% \text{ de internalización} = 100 \times [1 - (\text{muestra a } 37^\circ\text{C} - \text{blanco a } 37^\circ\text{C}) / (\text{muestra a } 4^\circ\text{C} - \text{blanco a } 4^\circ\text{C})]$$

Método de microscopía inmunofluorescente

En este método, se sembraron células de cáncer de mama 4T1 en cubreobjetos en los pocillos de dos placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos a una densidad de 3 x 10⁵ células en medio RPMI 1640 con FCS al 10 % y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 horas. Se retiró el medio de las placas y se añadieron a los pocillos respectivos 1,5 mL de anticuerpos de prueba (5 µg/mL) diluidos en medio RPMI 1640 sin suero. Ambas placas se colocaron a 4 °C durante 20 minutos para permitir la unión a la superficie de los anticuerpos. Después de la incubación de 20 minutos, los cubreobjetos se transfirieron de una de las placas a una nueva placa de 6 pocillos. Las diluciones de anticuerpos se retiraron de la segunda placa y se añadió medio RPMI 1640 sin suero precalentado y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora en una incubadora de cultivo de tejidos. Los cubreobjetos de la primera placa se lavaron dos veces con 5 % BSA/PBS enfriado en hielo, se enjuagaron una vez con IX PBS y luego se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4 % (Affymetrix) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, los cubreobjetos de la segunda placa se transfirieron a una nueva placa de 6 pocillos, se lavaron, enjuagaron y fijaron.

Después de tres lavados en IX PBS, las células de ambas placas se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 %, desoxicolato de sodio al 0,1 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se enjuagaron tres veces con IX PBS y luego se incubaron en 5 % BSA/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se incubaron los cubreobjetos con anticuerpo de conejo anti-proteína 1 de membrana asociada a lisosomas (LAMP1; Abcam, 24170) a diluciones de 1 µg/mL en 5 % BSA/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se enjuagaron tres veces con IX PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón-Alexa 647 y anti-IgG de conejo-Alexa 488 (cubreobjetos JAA-F11 de ratón) y anti-IgG humano-Alexa 647 y anti-IgG de conejo-Alexa 488 (quimérico y hJAA-F11) (Molecular Probes, Invitrogen), a una dilución de 1:500 en 5 % BSA/PBS. Se usó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo Alexa 488 para detectar el anticuerpo anti-LAMP 1. Los cubreobjetos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la

incubación, las células se enjuagaron tres veces con IX PBS en la oscuridad. Se colocaron cubreobjetos con las células de cara hacia abajo sobre reactivo Slowfade Gold (Molecular Probes, Life Technologies) con medio DAPI en portaobjetos microscópicos y se sellaron con esmalte de uñas. Las células se analizaron con microscopio de fluorescencia Axiolmager (Zeiss). Las imágenes se capturaron y analizaron mediante el uso del software AxioVision Release 4.8.2.

Estudios *in vivo* para probar la eficacia de JAA-F11 humanizado para detectar tumores de mama portadores de TF-Ag

Mediante el uso del anticuerpo JAA-F11 humanizado H2L2 obtenido de los estudios biológicos *in vitro* anteriores, se realizaron estudios de inmunolocalización en ratones para probar si el anticuerpo humanizado marcado con yodo-124 localizaría a los tumores de mama TF-Ag en los ratones.

Marcaje con [124]yodo del anticuerpo hJAA-F11 (H2L2)

El marcaje con [124]yodo del anticuerpo JAA-F11 humanizado se llevó a cabo mediante el uso del método de Bolton Hunter. Antes de la yodación, el anticuerpo humanizado se modificó primero mediante el uso de un reactivo de Bolton Hunter soluble en agua (Sulfo-SHPP) (Thermo Scientific, Rockford IL, EE.UU.). En resumen, se disolvieron 1,9 mg del anticuerpo hJAA-F11 en tampón de modificación (tampón borato 200 mM, pH 9,0). Se disolvieron cinco mg del reactivo Bolton Hunter soluble en agua en 1 mL de tampón de modificación inmediatamente antes de su uso. A continuación, se añadió a la muestra de anticuerpo 100 µL de la solución del reactivo de Bolton Hunter soluble en agua y se incubó en hielo durante 3 horas con mezcla periódica. Se eliminó el reactivo de Bolton Hunter soluble en agua que no había reaccionado al dializar contra solución salina tamponada con fosfato (PBS: fosfato de sodio 0,1 M, cloruro de sodio 150 mM). En esta etapa intermedia, el anticuerpo humanizado contiene un enlazador unido a algunas de las lisinas del anticuerpo y es estable durante 2 semanas.

Luego, se marcó el anticuerpo hJAA-F11 modificado mediante el uso del método de marcaje indirecto Chizzonite [158]. En resumen, se prehumedeció un tubo de yodación precubierto Pierce (Thermo Fisher, Rockford, IL, EE.UU.) con 1 mL de tampón de yodación High Tris (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, NaCl 0,15 M). Se decantó el tampón y luego se añadieron 100 µL de tampón de yodación HighTris directamente al fondo del tubo, seguido de la adición de 280 µL de (4,59 millicurie) de yoduro de sodio 1241 en solución de NaOH 0,02 M (IBA Molecular, Richmond, VA). Se realizó un conteo inicial mediante el uso de un calibrador de radioisótopos CRC 12 (Capintec). Se midió el pH de la mezcla para asegurar que estaba a pH 7, neutro. Después de 6 minutos de activación a temperatura ambiente, se añadió el yoduro activado a la solución de hJAA-F11 previamente modificada. Después de un período de incubación de 9 minutos, se incubaron 50 µL de tampón de eliminación (10 mg de tirosina/mL en tampón de yodación Tris; Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,4 M) y la mezcla durante 5 minutos. El propósito del tampón de eliminación es eliminar el yodo libre que reacciona con la tirosina en el tampón.

Luego, se añadió 1 mL de tampón Tris/NaCl/EDTA (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,4 M, EDTA 5 mM, azida sódica al 0,05 %) a la mezcla de reacción. A continuación, la muestra se añadió a una columna de desalinización de 10 mL que se preequilibró con tampón Tris/NaCl/EDTA. El tubo de muestra se lavó con 0,5 mL de tampón Tris/NaCl/EDTA y el lavado se añadió a la columna. La muestra se eluyó en quince fracciones de 500 µL cada una mediante el uso de tampón Tris/NaCl/EDTA y se probó la radiactividad. La eficiencia del marcaje radiactivo se determinó en la fracción con la mayor actividad mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El anticuerpo radiomarcado se inyectó en los animales dentro de las 2 horas posteriores al marcaje. Para asegurar que el JAA-F11 humanizado marcado mantiene su reactividad TF-Ag, también se llevó a cabo un radioinmunoensayo.

Modelos animales y de tumores

Los animales en este estudio se alojaron y utilizaron de acuerdo con las regulaciones de los Comités Institucionales de Uso y Cuidado de Animales (IACUC, por sus siglas en inglés). Todos los protocolos se aprobaron por la IACUC de la Universidad de Buffalo. Se implantaron células de cáncer de mama de ratón 4T1 en ratones Balb/C hembra de 7-8 semanas de edad al inyectar 5×10^4 células en 0,1 mL de D-PBS por vía subcutánea debajo de uno de los pezones derechos. Los ratones se dividieron en 2 grupos y se inyectaron con [124I]-hJAA-F11 (n=13) y 124I24 libre (n=7) 10-14 días después de la implantación del tumor por la vena de la cola y luego se sometieron a estudios de biodistribución y obtención de imágenes de micro-PET. Se tomaron imágenes de un ratón de cada uno de los 2 grupos y se siguió durante todo el estudio. Todos los ratones recibieron 0,2 g/L de agua con yoduro de potasio después de la inyección con el anticuerpo marcado y durante todo el estudio como régimen de bloqueo de la tiroides.

Estudios de biodistribución

Los ratones se sacrificaron al inyectar 0,1 mL de pentobarbital sódico (Fatal Plus) por vía intraperitoneal a las 72, 96, 168 y 192 horas después de la inyección del anticuerpo radiomarcado. En cada momento, se sacrificaron tres ratones que recibieron el anticuerpo marcado y dos ratones con yodo libre. Se recolectaron sangre, músculo, bazo, pulmones, riñones, corazón, hígado, intestino delgado y grueso, estómago, cerebro, piel, tejido tumoral, hueso, cola,

esófago, tiroides y ovarios y se colocaron en tubos de polipropileno de 5 mL pesados previamente. Estos tubos se volvieron a pesar para obtener el peso real de cada tejido/órgano. Se taparon todos los tubos y se midió la radiactividad mediante el uso de un contador gamma. La captación de radiactividad para cada tejido se calculó como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% ID/g) según la siguiente fórmula del apéndice 2:

Obtención de imágenes de micro-PET

La localización del anticuerpo marcado en un ratón de cada uno de los dos grupos se determinó a través de la obtención de imágenes de micro-PET mediante el uso de la cámara de microPET, Focus 120® (Siemens Concorde Microsystems) a las 24, 48, 72, 96, 168 y 192 horas después de la inyección mediante el uso de técnicas conocidas. Brevemente, antes del escaneo, se anestesiaron los ratones con O2/isoflurano (1 %-3 % de isoflurano) y luego se tomaron imágenes en posición prona en el pórtico del escáner de microPET. La ventana de exploración de emisiones se estableció entre 350 y 750 keV. La exploración se realizó durante 30 minutos para cada ratón.

Radioinmunoensayo

Para determinar la inmunorreactividad del anticuerpo radiomarcado, se realizó un radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). Se recubrió una placa de microtitulación con 100 µL de conjugado TF-Ag-BSA a 1,25 µg/mL en tampón de recubrimiento. El tampón se eliminó de los pocillos y se lavó con 1 % BSA/PBS-Tween. Se añadieron a los pocillos cien microlitros de diluciones seriadas de hJAA-F11 radiomarcado en 1 % BSA/PBS-T y se dejó que se unieran a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, el anticuerpo no unido se eliminó al lavar los pocillos con 1 % BSA/PBS-T tres veces manualmente mediante el uso de una pipeta multicanal. El hJAA-F11 unido se eliminó de la placa al incubar con 200 µL de tampón de ácido acético 1 M/NaCl 0,15 M (pH 2,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 100 µL de solución de cada pocillo en tubos de ensayo de polipropileno separados y se midió la radiactividad mediante el uso de un contador gamma.

Si bien la invención se ha descrito a través de modalidades específicas, las modificaciones de rutina serán evidentes para los expertos en la técnica. El alcance de la presente invención se establece en las reivindicaciones adjuntas.

Listado de secuencias

<110> THE RESEARCH FOUNDATION OF STATE UNIVERSITY OF NEW YORK Kate, Rittenhouse-Olson

<120> Anticuerpos humanizados anti-antígeno-TF

<130> 011520.01155

<150> 61/981,240

<151> 2014-04-18

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> ratón

<400> 1

Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr	Trp	Met	His
1				5					10	

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> ratón

<400> 2

ES 2 843 546 T3

Phe Ile Ser Pro Asn Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15
 Asp
 5
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> ratón
 <400> 3
 Arg Ser Phe Ile Gly Tyr Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 18
 20 <212> PRT
 <213> ratón
 <400> 4
 Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu Trp
 30
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 35 <213> ratón
 <400> 5
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp
 1 5 10
 <210> 6
 45 <211> 13
 <212> PRT
 <213> ratón
 <400> 6
 50 Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr Gly Ser Gly
 1 5 10
 55 <210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cadena de anticuerpo humanizado
 <400> 7
 65

ES 2 843 546 T3

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

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cadena de anticuerpo humanizado
 <400> 8

ES 2 843 546 T3

1 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 10 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 15 Gly Phe Ile Ser Pro Asn Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 20 Arg Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 Ala Arg Ser Phe Ile Gly Tyr Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 35 Thr Val Thr Val Ser Ser
 <210> 9
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cadena de anticuerpo humanizado
 40 <400> 9
 45 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

		20		25		30	
5		Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
		35		40		45	
10		Gly Phe Ile Ser Pro Asn Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe					
		50		55		60	
15		Arg Asp Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr					
		65		70		75	80
20		Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
			85		90		95
25		Ala Arg Ser Phe Ile Gly Tyr Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr					
			100		105		110
30		Thr Leu Thr Val Ser Ser					
			115				
	<210>	10					
	<211>	112					
	<212>	PRT					
	<213>	secuencia artificial					
	<220>						
	<223>	cadena de anticuerpo humanizado					
35	<400>	10					
40		Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly					
		1		5		10	15
45		Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser					
			20		25		30
50		Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser					
			35		40		45
55		Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro					
			50		55		60
60		Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile					
			65		70		75
		Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly					
			85		90		95
		Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
			100		105		110

<210> 11
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> cadena de anticuerpo humanizado

<400> 11

10

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

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser
 20 25 30

20

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

25

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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

30

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

35

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

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

40

<220>
 <223> cadena de anticuerpo humanizado

45

<400> 12

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

50

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser
 20 25 30

55

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

ES 2 843 546 T3

[illegible]

ES 2 843 546 T3

		Glu	Gly	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Pro	Gly	Ala
		1				5					10					15	
5		Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr
					20					25					30		
10		Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Lys	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35					40					45			
15		Gly	Phe	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
			50					55					60				
20		Arg	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr
		65					70					75					80
25		Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
						85					90					95	
30		Ala	Arg	Ser	Phe	Ile	Gly	Tyr	Asn	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
					100					105					110		
35		Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser										
					115												
		<210> 15															
		<211> 112															
		<212> PRT															
		<213> secuencia artificial															
		<220>															
		<223> cadena de anticuerpo humanizado															
40		<400> 15															

ES 2 843 546 T3

	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Thr	Ile	Val	Tyr	Ser	
				20					25					30			
10	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
			35					40					45				
15	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
20																	
	65					70					75				80		
25	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	
					85				90						95		
	Ser	His	Val	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	
				100					105					110			
30	<210> 16																
	<211> 112																
	<212> PRT																
	<213> secuencia artificial																
35	<220>																
	<223> cadena de anticuerpo humanizado																
	<400> 16																
40	Glu	Leu	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Asn	Leu	Gly	
	1				5					10					15		
45	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Thr	Ile	Val	Tyr	Ser	
				20					25					30			
50	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
			35					40					45				
55	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	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		
60	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	
					85				90						95		
65	Ser	His	Val	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
				100					105					110			

ES 2 843 546 T3

<210> 17
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> ratón

5

<400> 17

10

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

15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val Tyr Ser
 20 25 30

20

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

25

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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

30

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une con especificidad a Gal β 1-3GalNAc- α de TF-Ag, el anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada y una cadena ligera,
5 en donde la cadena pesada comprende una secuencia que consiste en:
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGFISPNT
DYTEYNQKFRDRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSFIGYNFDFWGQGT TVTVS (SEQ ID NO: 13) (H2a);
10 y en donde la cadena ligera comprende una secuencia que consiste en:
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQTIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKVDIK (SEQ ID NO: 15) (L2a).
2. El mAb de la reivindicación 1, en donde el mAb comprende una región constante de IgG humana.
- 15 3. El mAb de la reivindicación 1, en donde el mAb está conjugado a un agente seleccionado del grupo que consiste en fármacos quimioterapéuticos, toxinas e isótopos radiactivos.
4. Uno o más mAb de la reivindicación 1 para usar en un método para la profilaxis y/o terapia del cáncer en un individuo, en donde el cáncer comprende células cancerosas que expresan TF-Ag, el uso que comprende
20 administrar al individuo el uno o más mAb de la reivindicación 1, en donde el crecimiento, la supervivencia o la metástasis, o una combinación de las mismas, de las células cancerosas en el individuo se inhibe después de la administración.
5. El uno o más mAb para el uso de la reivindicación 4, en donde el mAb comprende una región constante de
25 IgG humana.
6. El uno o más mAb para el uso de la reivindicación 4, en donde el mAb se conjuga a un agente seleccionado del grupo que consiste en fármacos quimioterapéuticos, toxinas e isótopos radiactivos.
- 30 7. Una composición farmacéutica que comprende el mAb de acuerdo con la reivindicación 1.
8. Un cultivo celular *in vitro*, en donde las células en el cultivo celular expresan el mAb de acuerdo con la reivindicación 1.

Figura 1

	<u>FR1</u>					<u>CDR1</u>					<u>FR2</u>					<u>CDR2</u>																			
Kabat #	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	a	55	60	65																				
mJAAF11	EVQL	L	ES	G	A	E	L	A	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	SGYTFTTYWMH	WV	K	Q	R	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	FISPNTDYTEYNQKFRD
H1	EVQL	V	ES	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	SGYTFTTYWMH	WV	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	FISPNTDYTEYNQKFRD
H2	EVQL	L	ES	G	A	E	L	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	SGYTFTTYWMH	WV	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	FISPNTDYTEYNQKFRD
H3	EVQL	V	ES	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	SGYTFTTYWMH	WV	K	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	FISPNTDYTEYNQKFRD

	<u>FR3</u>					<u>CDR3</u>					<u>FR4</u>																																									
Kabat #	70	75	80	a	b	c	83	85	90	95	100a	105	110	113																																						
mJAAF11	KATLT	A	D	K	S	S	T	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	S	F	I	G	Y	N	F	D	F	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S				
H1	R	V	T	M	T	A	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	F	I	G	Y	N	F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
H2	R	V	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	F	I	G	Y	N	F	D	F	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
H3	KAT	M	T	A	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S	R	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	F	I	G	Y	N	F	D	F	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S		

Figura 2

	<u>FR1</u>					<u>CDR1</u>					<u>FR2</u>					<u>CDR2</u>																																																
Kabat#	1	5	10	15	20	25	a	b	c	30	35	40	45	50	55	60																																																
JAAF11	E	L	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	N	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	T	I	V	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D
L1	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	T	I	V	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	F	Q	R	P	G	Q	S	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	
L2	D	I	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	T	I	V	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	F	Q	R	P	G	Q	S	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	
L3	D	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	L	G	Q	P	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	T	I	V	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	R	P	G	Q	S	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D

	<u>FR3</u>					<u>CDR3</u>					<u>FR4</u>																																				
Kabat#	61	65	70	75	80	85	90	95	100	a																																					
JAAF11	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K
L1	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K
L2	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K
L3	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K

Figura 3

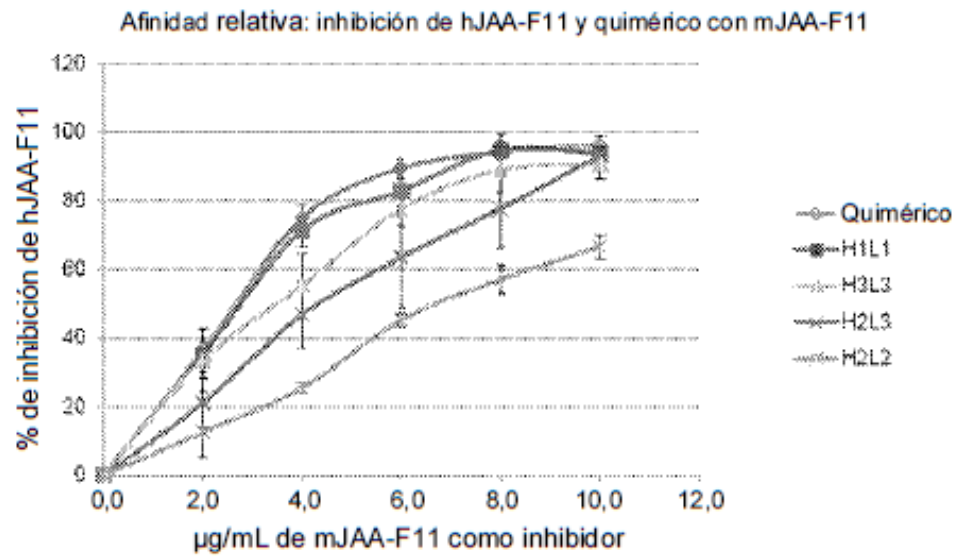


Figura 4

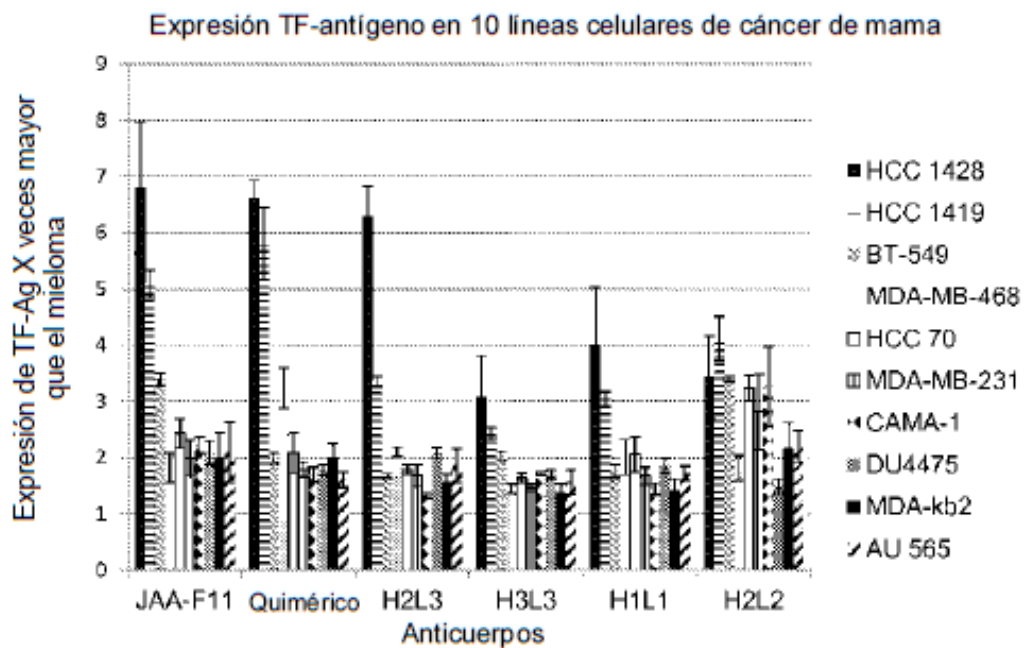


Figura 5

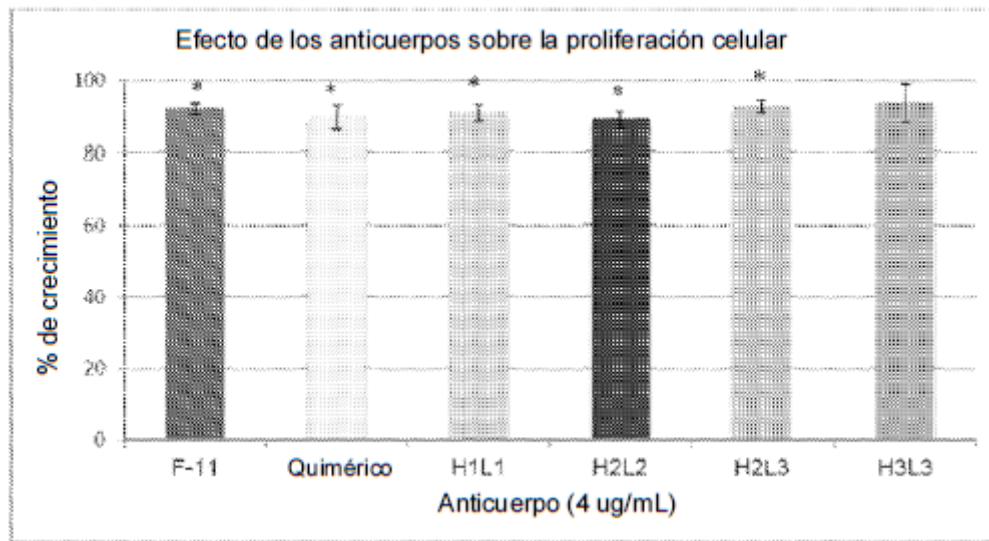


Figura 6A

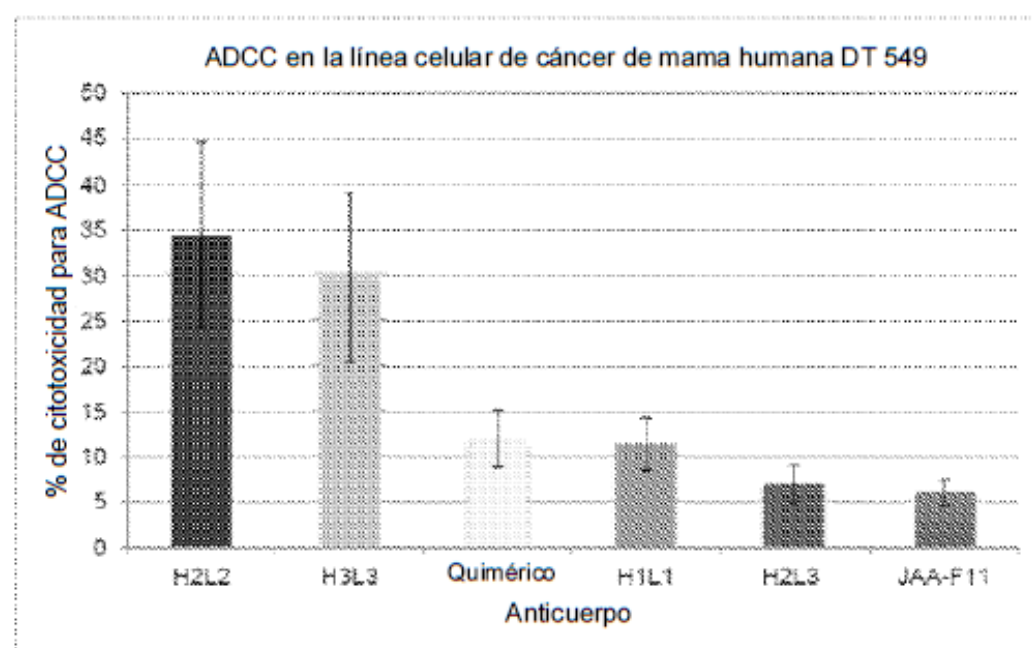


Figura 6B

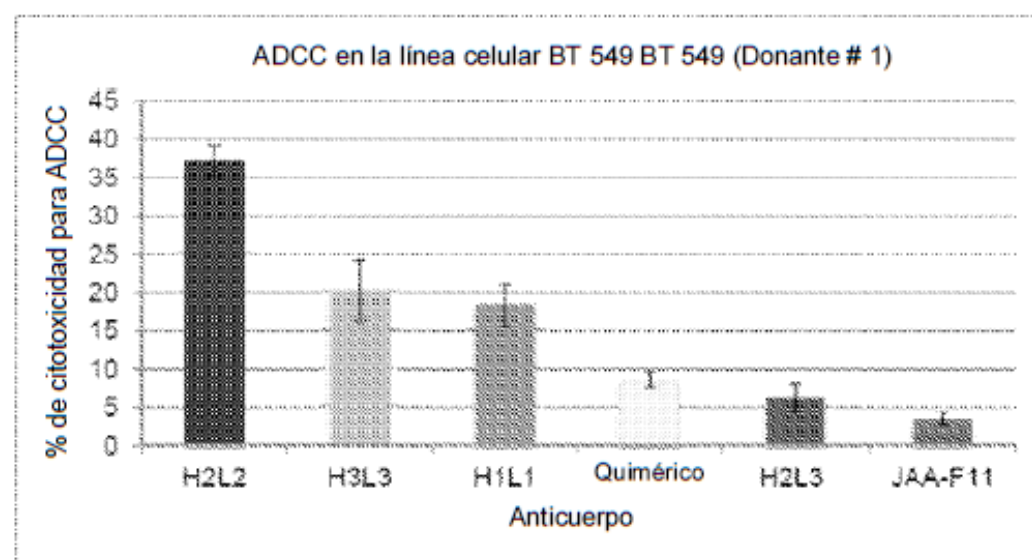


Figura 6C

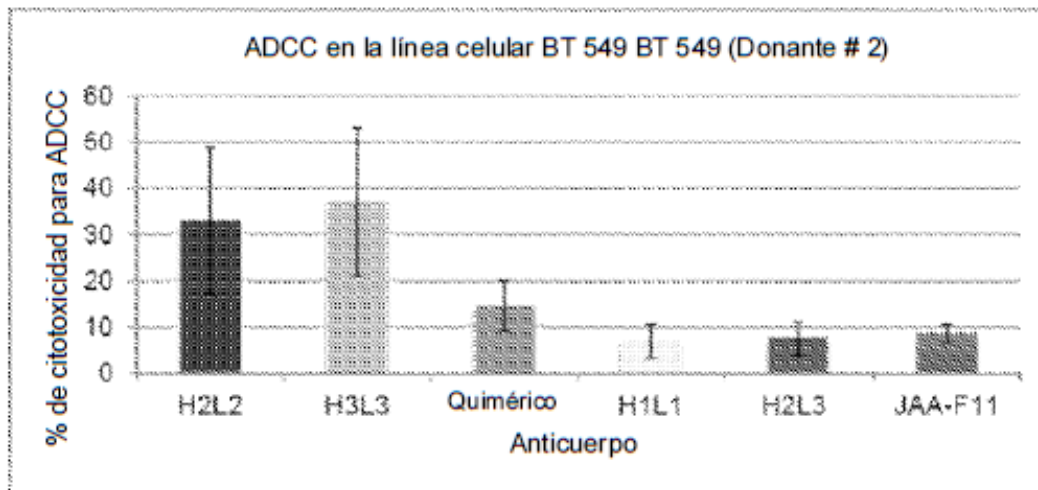


Figura 6D

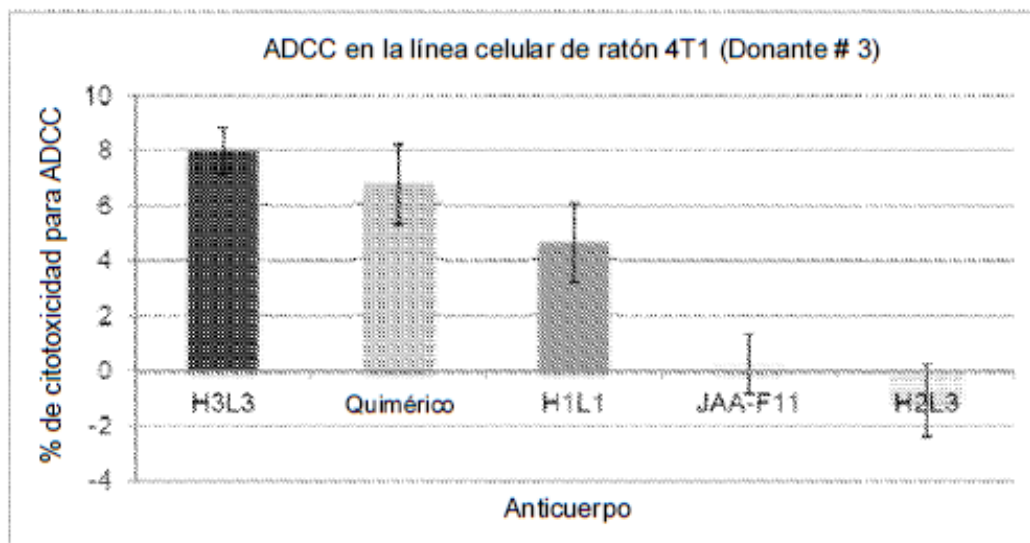


Figura 7

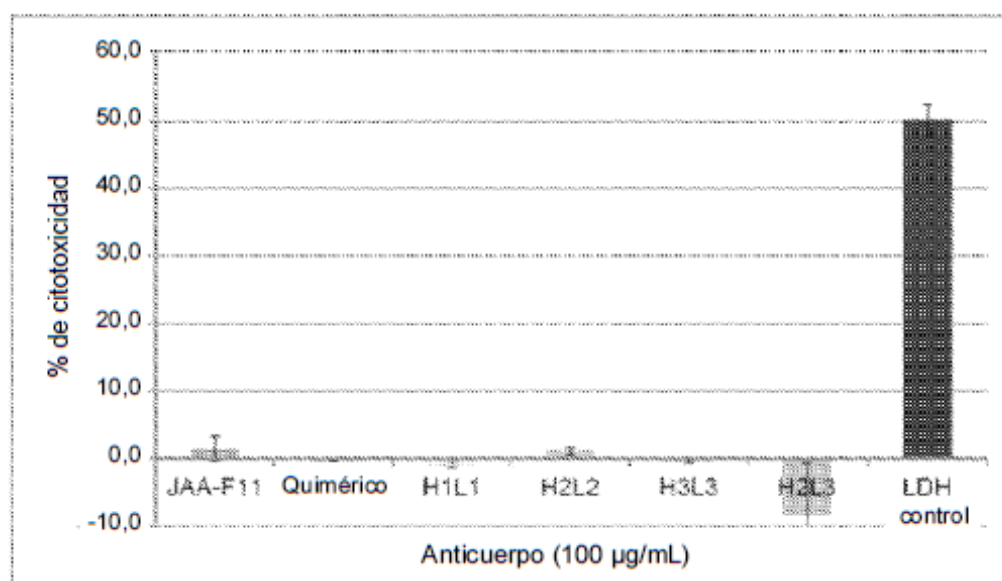


Figura 8

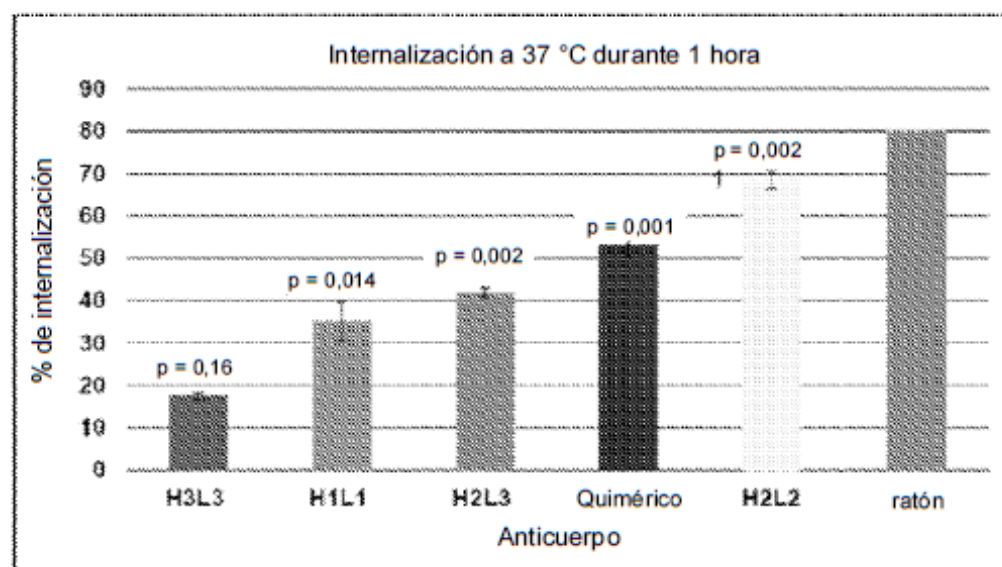


Figura 9

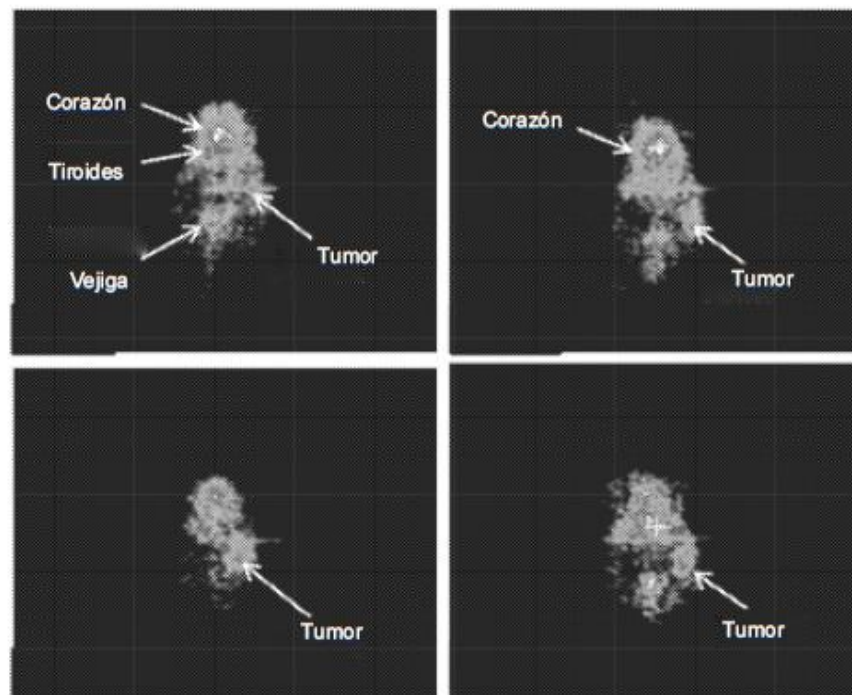


Figura 10

