



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 425**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)	C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/85 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)	C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)	G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)	A61K 49/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03716369 .8**

96 Fecha de presentación : **06.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1572077**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Usos del anticuerpo monoclonal 8H9.**

30 Prioridad: **08.03.2002 US 97558**
17.10.2002 US 273762
17.10.2002 PCT/US02/33331

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.04.2011

73 Titular/es:
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research
1275 York Avenue
New York, New York 10021, US

72 Inventor/es: **Cheung, Nai-Kong, V.**

74 Agente: **Álvarez López, Fernando**

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

Usos del anticuerpo monoclonal 8H9.

5 Antecedentes de la invención

Los antígenos de superficie limitados a tumor pueden ser dianas para terapias de diagnóstico e inmunitarias. El anticuerpo monoclonal 8H9 es un hibridoma IgG1 murino derivado de la fusión de células SP2/0 de mieloma de ratón y linfocitos esplénicos de ratones BALB/c inmunizados con neuroblastoma humano. Por inmunohistoquímica, el 8H9 era altamente reactivo con tumores cerebrales humanos, sarcomas infantiles, neuroblastomas y menos con adenocarcinomas. Entre los tumores cerebrales primarios, 15/17 glioblastomas, 3/4 gliomas mixtos, 4/11 oligodendrogliomas, 6/8 astrocitos, 2/2 meningiomas, 3/3 schwannomas, 2/2 meduloblastomas, 1/1 neurofibroma, 1/2 tumores neurogliales, 2/3 endodermas y 1/1 pineoblastoma dieron positivo. Entre los sarcomas, 21/21 Ewing/PNET, 28/29 rhabdomyosarcomas, 28/29 osteosarcomas, 35/37 tumores desmoplásicos de células redondas pequeñas, 2/3 sarcomas sinoviales, 4/4 leiomyosarcomas, 1/1 histiocitoma fibroso maligno y 2/2 sarcomas no diferenciados dieron positivo con 8H9. 87/90 neuroblastomas, 12/16 melanomas, 3/4 hepatoblastomas, 7/8 tumores de Wilm, 3/3 tumores rabdoide y 12/27 adenocarcinomas también dieron positivo. A diferencia, el 8H9 no fue reactivo con tejidos humanos normales que incluyen médula ósea, colon, estómago, corazón, pulmón, músculo, tiroides, testículos, páncreas y cerebro humano (lóbulo frontal, cerebelo, protuberancia y médula espinal). La reactividad con tejido de mono cinomolgo normal fue similarmente limitada. La inmunofluorescencia indirecta localizó el antígeno reconocido por 8H9 en la membrana celular. El antígeno es sensible a proteinasa y no está fácilmente modulado por la superficie celular. El 8H9 inmunoprecipitó una banda de 58 kD tras el tratamiento con N-glucanasa, lo más probable una proteína con grado heterogéneo de glucosilación. Este novedoso sistema anticuerpo-antígeno puede tener posibilidades de elegir como diana tumores.

Los anticuerpos monoclonales tales como 3F8 (1) y 14.18 (2) contra G_{D2} en neuroblastoma, M195 contra CD33 en leucemia aguda (3), anticuerpos dirigidos contra HER2 en cáncer de mama (4) y anticuerpos dirigidos contra CD20 en linfoma (5) han mostrado eficacia en ensayos clínicos recientes. El pronóstico en tumores cerebrales de la glía y tumores metastásicos, mesenquimatosos y neuroectodérmicos sigue siendo pésimo a pesar de las innovaciones en quimioterapia y radioterapia. La inmunoterapia puede ofrecer nuevas posibilidades para mejorar el resultado en estos pacientes.

Los antígenos tumorales expresados en la membrana celular son posibles dianas en inmunoterapia. Ejemplos de antígenos tumorales expresados en tumores de la glía incluyen moléculas de adhesión de células neurales (6), gangliosidos tales como G_{D2} y G_{M2} (7) y antígenos neurohematopoyéticos (8). Las recientes investigaciones se han centrado en receptores de factores de crecimiento como inmunodianas, en particular el receptor del factor de crecimiento epidérmico mutante de tipo III (EGFRvIII) que se ha mostrado que se expresa en el 50% de los tumores cerebrales de la glía (9). A pesar de la expresión universal de NCAM por células neuronales, dos estudios clínicos han utilizado anticuerpos dirigidos contra NCAM en pacientes. Se mostró que el mAb UJ13A se acumulaba localmente en gliomas en virtud de la alteración de la barrera hematoencefálica (10) y se usó otro anticuerpo, ERIC-1, en un entorno terapéutico en cavidades de glioma resecionadas con algún beneficio clínico (11).

Estudios recientes han elegido como diana inmunoterapia para la matriz extracelular alrededor de células tumorales. Se ha informado que la tenascina se expresa en el 50-95% de los tumores cerebrales de la glía, además de en tumores mesenquimatosos, carcinomas y células de la glía, de hígado y de riñón humanas normales (12). Recientemente se ha informado que anticuerpos monoclonales dirigidos contra tenascina 81C6 (13) y BC-2 y BC-4 (14) administrados de forma intracavitaria muestran eficacia en el tratamiento de pacientes con gliomas malignos. Sin embargo, como estos antígenos también están presentes a grados variables en células neurales y no neurales humanas normales, su utilidad clínica dependería de su expresión en exceso por tumores cerebrales cuando se compara con tejidos normales. Con la excepción de EGFRvIII, los antígenos de los tumores de la glía descritos hasta la fecha se encuentran generalmente en tejido cerebral normal, o están limitados a compartimentos intracelulares, por tanto, con utilidad clínica limitada para la elección como diana de anticuerpos.

Los antígenos de membrana que han sido elegidos como diana en osteosarcoma incluyen G_{D2} (15), CD55 (16) y un antígeno asociado a osteosarcoma aún sin definir reconocido por los MoAb TP-1 y TP-3 (17). Sin embargo, estos antígenos están presentes a grados variables en tejidos normales.

Similarmente, la glicoproteína p 30/32 codificada por el oncogén MIC2 y reconocida por el anticuerpo monoclonal 013 en la familia de tumores de Ewing se expresa en tejidos normales (18). En rhabdomyosarcoma, la familia MyoD de proteínas oncofetales es de localización nuclear (19) y, por tanto, inaccesible a inmunoterapia que elige como diana anticuerpos.

Un antígeno tumoral ideal para la inmunoterapia de elección de diana estaría ausente en tejidos normales y se expresaría abundantemente en la superficie celular de tumores. Tales antígenos específicos de tumor, por ejemplo, idiotipos en linfoma de linfocitos B, son raros (20). Además, un antígeno específico de tumor "genérico" expresado en células tumorales de linaje variable reconocidas por anticuerpos monoclonales puede tener utilidad más amplia en estrategias basadas en anticuerpos. Los inventores describen aquí un antígeno asociado a tumor novedoso reconocido por un anticuerpo monoclonal murino 8H9 expresado en membranas celulares de un amplio espectro de tumores de origen neuroectodérmico, mesenquimatoso y epitelial, con distribución limitada en tejidos normales.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo y un vehículo adecuado. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un anticuerpo distinto del anticuerpo monoclonal 8H9 que comprende las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo que pueden unirse al mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal 8H9.

La presente invención proporciona una sustancia que puede inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 8H9. En una realización de la sustancia es un anticuerpo.

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado en el que la región determinante de la complementariedad es NYDIN para CDR1, WIFPGDGSTQY para CDR2, QTTATWFAY para CDR3 para la cadena pesada y RASQSIDYLH para CDR1, YASQIS para CDR2, QNGHSFPLT para CDR3 para la cadena ligera. La presente invención proporciona además el anticuerpo anterior, en el que las otras secuencias son de origen humano.

La invención también proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo y un vehículo adecuado que incluye secuencias como se exponen en la Figura 33. En una realización, las secuencias están mutadas. La presente invención también proporciona la forma mutada de 8H9 para reducir el fondo y citotoxicidad. Podrían establecerse otras mutaciones que podrían lograr la función anteriormente descrita. En otra realización, el anticuerpo incluye secuencias como se exponen en la Figura 34.

Además, la invención proporciona una composición que comprende los anticuerpos anteriores y una molécula aislada de ácido nucleico que codifica los anticuerpos anteriores. La presente invención también proporciona la molécula aislada de ácido nucleico anterior, en la que las secuencias se exponen en la Figura 33.

Además, la presente invención proporciona un vector que comprende las moléculas de ácidos nucleicos anteriores. La invención también proporciona una célula que comprende el vector anterior.

La presente invención proporciona un scFv de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo. En una realización, el scFv está directamente o indirectamente acoplado a un agente citotóxico. La presente invención proporciona una célula que comprende 8H9-scFv. En una realización, es un eritrocito. La presente invención también proporciona una célula modificada por genes 8H9-scFv. La presente invención proporciona un liposoma modificado por 8H9-scFv.

La presente invención proporciona un procedimiento para destruir directamente, o administrar un fármaco, ADN, ARN o derivados de los mismos a la célula que porta el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 8H9 o para obtener imágenes de células o tumores que portan dicho antígeno usando el 8H9-scFv aislado o célula o liposoma que comprende el 8H9-scFv.

La presente invención proporciona una proteína con aproximadamente 58 kilodalton de peso molecular que reacciona específicamente con el anticuerpo monoclonal 8H9. Si esta proteína de 58 kD está glucosilada, el peso molecular aparente es aproximadamente 90 kilodalton.

La presente invención también proporciona un anticuerpo producido inmunizando el antígeno de 8H9 o una porción específica del mismo, que es inmunogénica.

La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de 8H9. Además, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con la molécula que codifica el antígeno de 8H9. La molécula de ácido nucleico incluye, pero no se limita a, ADN sintético, ADN genómico, ADNc o ARN.

La presente invención proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de 8H9 o una porción del mismo. La presente invención proporciona una célula que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de 8H9.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir la proteína que se une al anticuerpo monoclonal 8H9 que comprende clonar la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de 8H9 en un vector apropiado que expresa dicha proteína en células apropiadas y recuperar dicha proteína expresada.

La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de anticuerpo usando la proteína producida por el procedimiento anterior. La presente invención también proporciona anticuerpos producidos por el procedimiento anterior. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En otra realización, el anticuerpo es uno monoclonal.

La presente invención proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de células tumorales que comprende poner en contacto dichas células tumorales con una cantidad apropiada de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo, o el anticuerpo de la reivindicación producido por el antígeno de 8H9 expresado o un derivado del anticuerpo producido del mismo.

La presente invención proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad apropiada de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo, o el anticuerpo producido por el antígeno de 8H9 expresado o un derivado del mismo.

La presente invención proporciona un procedimiento para obtener imágenes de un tumor en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo monoclonal 8H9 marcado o derivados marcados, o un anticuerpo marcado producido por el antígeno de 8H9 expresado o un derivado marcado. En la realización, los anticuerpos o derivados están marcados por un radioisótopo.

La presente invención proporciona un procedimiento de reducción de células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo, o un anticuerpo monoclonal producido por el antígeno de 8H9 expresado o un derivado del mismo, en el que el anticuerpo o derivado está acoplado a un agente citotóxico al sujeto.

La presente invención proporciona un procedimiento para evaluar el potencial de portar tumores de un sujeto que comprende medir la expresión del antígeno de 8H9 en el sujeto, en el que el aumento de la expresión de dicho antígeno indica mayor potencial de portar tumores del sujeto.

La presente invención proporciona un animal transgénico que comprende un gen exógeno que codifica el antígeno de 8H9. La presente invención también proporciona un animal genomanipulado en el que se ha genomanipulado el gen que codifica el antígeno análogo de ratón de 8H9.

Finalmente, la presente invención proporciona un procedimiento para cribar nuevos compuestos antitumorales que comprende poner en contacto el animal transgénico anterior con el compuesto probado y medir el nivel de expresión del antígeno de 8H9 en dicho animal transgénico, indicando una disminución en el nivel de expresión que el compuesto puede inhibir la expresión del antígeno de 8H9 y que es un candidato antitumoral.

Descripción detallada de las figuras

Primera serie de experimentos

Figura 1. (1A) Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas (10X) inmunoteñido con 8H9 que muestra una fuerte positividad de membrana e histología típica (1B) Glioblastoma multiforme teñido con 8H9 que muestra unión a membranas celulares y estroma fibrilar (1C) Rabdomiosarcoma embrionario teñido con 8H9 que muestra reactividad con la membrana celular (1D) Tinción negativa de rabdomiosarcoma embrionario con MOPC21, un anticuerpo de control IgG1 irrelevante.

Figura 2. Persistencia de la unión de 8H9 a células U2OS (2A) y células NMB7 (2B) como se estudia por inmunofluorescencia indirecta. Eje X: inmunofluorescencia relativa, eje y: horas de incubación. Las células U2OS se hicieron reaccionar con 8H9 y HB95, y las células NMB7 con 8H9 y 3F8. Después del lavado, las células se recultivaron y la persistencia de la inmunorreactividad de los anticuerpos primarios se evaluó por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpo secundario conjugado con FITC. La inmunofluorescencia relativa de 8H9 en células U2OS disminuyó el 80% después de 48 h (HB95 el 11%), mientras que la de células NMB7 no mostró descenso significativo a 36 h (3F8 descendió el 39%).

Figura 3. Efecto de Pronase E sobre la inmunorreactividad de 8H9 con células HTB82, U2OS y NMB7 y sobre la inmunorreactividad de 3F8 con células NMB7 como se estudia por inmunofluorescencia indirecta. Eje X: concentración de Pronase E (mg/ml); eje y: inmunofluorescencia relativa.

Segunda serie de experimentos

Figura 1. (Figura 4 en las figuras adjuntas) 4 ciclos de 3F8 y respuesta de HAMA a bajo nivel están asociados a supervivencia prolongada.

Figura 2. (Figura 5 en las figuras adjuntas) Supervivencia a largo plazo mejorada después de MoAb 3F8 en pacientes con NB de fase 4 recientemente diagnosticado > 1 año de edad en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.

N4 a N7 son protocolos secuenciales durante 15 años. N4 y N5 son quimioterapia + ABMT, N6 es quimioterapia + 3F8, y N7 es N6 + ¹³¹I-3F8.

Figura 3. (Figura 6 en las figuras adjuntas) Modulación de antígenos tras la unión a 8H9.

Figura 4. (Figura 7 en las figuras adjuntas) A 120 h: ^{125}I -8H9 localizado en los tumores (N=4), mientras que el anticuerpo de control 2C9 (IgG1 de ratón) permaneció en mezcla de sangres/hígado (N=4).

Figura 5. (Figura 8 en las figuras adjuntas) La alta relación tumor-tejido fue específica para ^{125}I -8H9 frente al MoAb de control ^{125}I -2C9 en xenoinjertos de RMS.

Tercera serie de experimentos

Figura 1. (Figura 9 en las figuras adjuntas) Reactividad con 8H9 con líneas celulares de sarcoma de Ewing.

Se muestra el análisis de citometría de flujo de la unión de 8H9 a nueve líneas celulares de sarcoma de Ewing. La designación para cada línea se muestra en la esquina superior derecha. Se muestra la fluorescencia FL1 de isotipo (línea negra de puntos), CD99 (línea negra fina) y 8H9 (línea negra gruesa).

Figura 2. (Figura 10 en las figuras adjuntas) Falta de reactividad con 8H9 con linfocitos T o células progenitoras de médula ósea. Se analizan células Cd3+ electrónicamente dependientes de sangre periférica de un donante normal (panel superior) para el isotipo (línea de puntos), CD99 (línea negra fina) y 8H9 (línea negra gruesa). Se analizan células CD34+ electrónicamente dependientes de médula ósea humana fresca de un donante normal (panel inferior) para la tinción de isotipo (línea de puntos) y 8H9 (línea negra gruesa).

Figura 3. (Figura 11 en las figuras adjuntas) El análisis de PCR en tiempo real de t(11,22) en PBMC artificialmente contaminadas cuantifica con exactitud el transcrito de EWS/FLI 1 para hasta cinco diluciones logarítmicas de tumor. Se representa el tiempo de cruce (eje x) frente a la fluorescencia (eje y) 11a: PCR no anidada de 10×10^6 PBMC contaminadas de 1:10 a 1:10⁶. En el recuadro se muestra una relación lineal entre el tiempo de cruce y el logaritmo de la concentración de células para 4 diluciones logarítmicas de tumor. Las muestras contaminadas a menos de 1:10⁴ no muestran positividad detectable en este ensayo. 11b: PCR anidada de 10×10^6 PBMC contaminadas de 1:10 a 1:10⁷. Se observa una relación lineal durante 5 diluciones logarítmicas de tumor de 1:100 a 1:10⁶.

Figura 4. (Figura 12 en las figuras adjuntas) El análisis de PCR cuantitativa del purgado demuestra 2-3 reducciones logarítmicas en sangre periférica y adiciones de células progenitoras con células de sarcoma de Ewing. Se representa el número de ciclos (eje x) frente a la fluorescencia (eje y). Las muestras experimentales se realizaron con diluciones contaminadas patrón mostradas en el recuadro 12a: Análisis de PCR no anidada de 1×10^6 de médula ósea seleccionada con no CD34 prepurgada y pospurgada de un donante sano normal contaminado a un nivel de 1:100. Se demuestra una reducción de dos logaritmos en la carga tumoral en la muestra pospurgada que muestra un nivel de contaminación a 1:10⁴. 12b: Análisis de PCR anidada de células seleccionadas con CD34 prepurgadas y pospurgadas recogidas tras la inmovilización en G-LCR de un paciente con sarcoma de Ewing. Como este paciente fue positivo para EWS/FLI, las células CD34 se añadieron con sarcoma de Ewing a un nivel de 1:10³. Una reducción de tres logaritmos en la carga tumoral se demuestra en la muestra pospurgada que muestra un nivel de contaminación a 1:10⁶. 12c: Análisis de PCR anidada de PBMC prepurgadas y pospurgadas de una capa leucocítica de donantes sanos normales contaminada a un nivel de 1:100. Una reducción superior a 3 logaritmos en la carga tumoral se demuestra en la muestra pospurgada que muestra un nivel de contaminación inferior a 1:10⁶. 12d: Análisis de PCR anidada de no PBMC prepurgadas y pospurgadas a partir de una capa leucocítica de donantes sanos normales contaminada a un nivel de 1:10³. Se demuestra una reducción de 3 logaritmos en la carga tumoral en la muestra pospurgada que muestra un nivel de contaminación a 1:10⁶.

Figura 5. (Figura 13 en las figuras adjuntas) La contaminación de fracciones de aféresis elutriadas de pacientes se demuestra a un nivel de 1:10⁵-1:10⁶. Análisis de PCR cuantitativa de fracciones de aféresis de pacientes que presentan sarcoma de Ewing diseminado. Se representa el número de ciclos (eje x) frente a la fluorescencia (eje y). Se comparan muestras de pacientes con diluciones contaminadas patrón. El paciente A (panel superior) muestra contaminación de todas las fracciones a un nivel de 1:10⁵-1:10⁶. El paciente B (panel central) muestra contaminación en la fracción leucocítica sólo a un nivel de aproximadamente 1:10⁶. El paciente C (panel inferior) muestra contaminación en varias fracciones a un nivel similar.

Figura 6. (Figura 14 en las figuras adjuntas) La capacidad de UFC progenitoras no está afectada por el purgado basado en 8H9. Las unidades formadoras de colonias de células seleccionadas con CD34 a partir de médula ósea de un donante sano normal (eje x) se representan para muestras pre y pospurgadas.

Figura 7. (Figura 15 en las figuras adjuntas) La proliferación de linfocitos T mediada por OKT3 es invariable después del purgado cuando se comparó con la proliferación prepurgada. Los linfocitos T de la capa leucocítica de donantes sanos normales se evaluaron para la captación de [³H]-timidina como medida de la proliferación de linfocitos T con una concentración decreciente de OKT3. La captación se mide como recuentos por millón (eje y) y se representa frente a la de concentración de OKT3 para prepurgada (cuadrado relleno) y pospurgada (círculo relleno).

Cuarta serie de experimentos

Figura 1. (Figura 16 en las figuras adjuntas) DSRCT (40X) que demuestra la reactividad de la membrana celular y del estroma con 3F8.

Figura 2. (Figura 17 en las figuras adjuntas) DSRCT (40X) que muestra una fuerte y homogénea reactividad de la membrana celular y del estroma con 8H9.

5 Quinta serie de experimentos

Figura 1. (Figura 18 en las figuras adjuntas) Inhibición de 8H9 por 2E9 antiidiotípico por análisis de FACS. 18A: La tinción de células de neuroblastoma LAN-1 con 5 ug/ml de 8H9 (pico sombreado) no se inhibió a baja concentración de 2E9 (2 ug/ml, línea continua), sino casi completamente a concentración de 10 ug/ml (línea de puntos) superponible con el control de anticuerpo negativo (línea continua). 18B: La tinción de células de neuroblastoma LAN-1 con 5 ug/ml de 3F8 (dirigido contra GD2, pico sombreado) no se inhibió por ninguna concentración (2 ug/ml, línea continua, o 200 ug/ml, línea de puntos) de 2E9. 18C: La tinción de células de rhabdomyosarcoma HTB-82 con 5 ug/ml de 8H9 (pico gris) no se inhibió a baja concentración (2 ug/ml, línea continua), sino completamente a 10 ug/ml de 2E9 (línea continua) superponible con el control de anticuerpo negativo (pico negro).

Figura 2. (Figura 19 en las figuras adjuntas) SDS-PAGE (hileras a y b) y transferencia Western (c y d) de scFv-Fc de 8H9. H= cadena pesada de 8H9, L= cadena ligera de 8H9, scFv-Fc= proteína de fusión quimérica entre scFv de 8H9 y el dominio 1-CH2-CH3 humano. Con 2-mercaptoetanol: hileras a, b y c. Gel nativo: hilera d. SDS-PAGE se tiñó con azul de Coomassie; transferencia Western con anticuerpo antiidiotípico 2E9.

Figura 3. (Figura 20 en las figuras adjuntas) Análisis de FACS de tinción de scFv-Fc de 8H9 de células de rhabdomyosarcoma HTB82. 20A: La inmunofluorescencia aumentó con concentraciones de scFv-Fc de 8H9 (1, 5, 25, 125 ug/ml), el pico sombreado no es control de anticuerpo. 20B: La tinción de células (5 ug/ml de scFv-Fc de 8H9, línea continua fina) se inhibió completamente (línea continua gruesa) a 1 ug/ml de anticuerpo antiidiotípico 2E9, el pico sombreado no es control de anticuerpo.

Figura 4. (Figura 21 en las figuras adjuntas) Inmunoescintigrafía de tumores humanos usando scFv-Fc de 8H9 marcado con ¹²⁵I. Los ratones xenoinjertados con neuroblastoma LAN-1 humano recibieron inyecciones retro-orbitales de 25 uCi de anticuerpo marcado con I. 24 h, 48 h y 7 días después de la inyección, los animales se anestesiaron y se obtuvieron imágenes con una gammacámara.

Figura 5. (Figura 22 en las figuras adjuntas) Eliminación de la sangre de 8H9 quimérico marcado con ¹²⁵I y 8H9 nativo marcado con ¹²⁵I. Ratones xenoinjertados con neuroblastoma LAN-1 humano recibieron inyecciones retro-orbitales de anticuerpomarcado con ¹²⁵I. Se representó el porcentaje de dosis inyectada/g de muestras de sangre seriadas con el tiempo.

Sexta serie de experimentos

Figura 1. (Figura 23 en las figuras adjuntas) Enriquecimiento por afinidad antiidiotípica de líneas productoras. Se tiñeron líneas productoras con MoAb antiidiotípico 2E9 antes (pico sombreado, A y B) y después de la primera (pico de línea de puntos, A) y la segunda purificación por afinidad (línea continua gruesa, A) y después de la primera (línea de puntos, B) y la segunda subclonación (línea continua B), mostrando una mejora en la expresión de scFv. Por FACS, la línea indicadora K562 mostró mejora de la expresión de scFv después de la primera (línea de puntos, C) y la segunda purificación por afinidad (línea continua gruesa, C) de la línea productora, y después de la primera (línea de puntos, C) y la segunda subclonación (línea continua gruesa, D) de la línea productora cuando se comparó con líneas productoras no purificadas (picos sombreados, C y D), consecuente con la mejora en la eficiencia de transducción génica. Las curvas de línea continua fina en cada figura representan línea no productora (A y B) o K562 sin infectar (C y D).

Figura 2. (Figura 24 en las figuras adjuntas) Análisis de citometría de flujo de la expresión de scFv. Se ensayaron linfocitos modificados con genes scFv-CD28 de 8H9 cultivados para su expresión en scFv usando MoAb antiidiotípico 2E9 (curvas continuas) y MoAb IgG1 de rata de control como control (histogramas sombreados) del día 13 al día 62. Aunque una proporción sustancial de células fueron positivas el día 13, se volvieron homogéneas el día 21 y persistieron hasta el día 62, cuando pareció que la fluorescencia media global disminuyó.

Figura 3. (Figura 25 en las figuras adjuntas) Expansión *in vitro* de linfocitos humanos primarios modificados con el gen scFv-CD28 de 8H9. La expansión clónica se expresó como una fracción del número de células viables iniciales. Se añadió EL-2 (100 U/ml) después de la infección retroviral y estuvo presente durante todo el periodo de cultivo *in vitro*. Las barras cortas representan los días en los que el anticuerpo antiidiotípico 2E9 soluble (3-10 ug/ml) estuvo presente en el cultivo.

Figura 4. (Figura 26 en las figuras adjuntas) Citotoxicidad contra líneas celulares tumorales: Los linfocitos modificados con el gen scFv-CD28 de 8H9 del día 56 de cultivo (scFv-T) se ensayaron por ensayo de liberación de ⁵¹Cr en presencia o ausencia de 8H9 (50 ug/ml de concentración final) como agente bloqueante de antígenos. Los linfocitos de control (LAK) del mismo donante, pero no modificados con el gen, se cultivaron bajo las mismas condiciones que las células modificadas con genes. 26A: Neuroblastoma NMB-7. 26B: Neuroblastoma LAN-1. 26C: Rhabdomyosarcoma HTB-82. 26D: Linfoma de Daudi.

Figura 5. (Figura 27 en las figuras adjuntas) Supresión del crecimiento tumoral de rhabdomyosarcoma en ratones SCID. El rhabdomyosarcoma HTB-82 humano fue fuertemente reactivo con 8H9, pero no con los anticuerpos 5F11 (dirigidos contra GD2). Grupo experimental: Linfocitos humanos modificados con el gen scFv-CD28 de 8H9 (círculos rellenos). Grupos de control: Sin células + 2E9 (círculos abiertos), linfocitos sin modificar cultivados (LAK) + 2E9 (triángulos abiertos), o linfocitos modificados con scFv-CD28 de 5F11 + 1G8 [MoAb antiidiotípico dirigido contra 5F11 de rata] (triángulos rellenos).

Séptima serie de experimentos

Figura 1. (Figura 28 en las figuras adjuntas) Obtención secuencial de imágenes de ratón sin pelo que porta xenoinjerto de RMS 24, 48 y 172 h después de la inyección con 4,4 MBq de ^{125}I -8H9 con respecto a un ratón que porta xenoinjerto de RMS del que se obtuvieron imágenes 172 h después de la inyección con 4,4 MBq de ^{125}I -2C9.

Figura 2. (Figura 29 en las figuras adjuntas) Cinética de la sangre de ^{125}I -8H9 en ratones sin pelo con xenoinjertos de RMS. Las barras de error representan el EEM.

Figura 3. (Figura 30 en las figuras adjuntas) Comparación de la biodistribución de ^{125}I -8H9 a 24, 48 y 172 h después de la inyección en xenoinjerto y tejidos normales.

Figura 4. (Figura 31 en las figuras adjuntas) Comparación de la biodistribución de ^{125}I -8H9 con la del MoAb dirigido contra citoqueratina no específico ^{125}I -2C9 (barras rellenas) en xenoinjertos y tejidos normales.

Figura 5. (Figura 32 en las figuras adjuntas) Efecto antitumoral sobre xenoinjertos de RMS: ^{131}I -8H9 frente a MoAb de control negativo I-3F8. Cada ratón recibió 18,5 MBq de MoAb radiomarcado (5 ratones por grupo).

Figura 33: Secuencia génica de scFv de 8H9 (codificante y complementaria). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están marcadas en recuadros en el siguiente orden: CDR-1 (HC, cadena pesada), CDR-2 (HC), CDR-3 (HC), CDR-1 (LC, cadena ligera), CDR-2 (LC), CDR-3 (LC).

Figura 34: Se representan las secuencias de genes y de aminoácidos de scFv de 8H9. El scFv de 8H9 mutado lleva la siguiente mutagénesis dirigida a sitio (VH: K13E y VL: R18Q, R45Q, K103E, K107E) para disminuir PI de 6,4 a 4,8, y carga neta de -1 a -9, una estrategia para disminuir la adherencia de tejido normal no específico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo y un vehículo adecuado. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización de la composición anterior, el derivado es un scFv. En una realización separada, el anticuerpo es una construcción de fusión de anticuerpos. En otra realización, el anticuerpo es un scFv-Fc.

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado, en el que la región determinante de la complementariedad es NYDIN para CDR1, WIFPGDGSTQY para CDR2, QTTATWFAY para CDR3 para la cadena pesada y RASQISDYHL para la CDR1, YASQIS para CDR2, QNGHSFPLT para CDR3 para la cadena ligera. La presente invención proporciona además el anticuerpo anterior, en el que las otras secuencias son de origen humano.

La invención también proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo y un vehículo adecuado, que incluye secuencias como se exponen en la Figura 33. En una realización, las secuencias están mutadas. La presente invención también proporciona la forma mutada de 8H9, de manera que se reduzca el fondo y la citotoxicidad. Podrían establecerse otras mutaciones que logran la función anteriormente descrita. En otra realización, el anticuerpo incluye secuencias como se exponen en la Figura 34.

Además, la invención proporciona una composición que comprende los anticuerpos anteriores y una molécula de ácido nucleico aislado que codifica los anticuerpos anteriores. La presente invención también proporciona la molécula de ácido nucleico aislada anterior, en la las secuencias se exponen en la Figura 33.

La presente invención también proporciona un péptido o polipéptido que comprende: NYDIN, WIFPGDGSTQY, QTTATWFAY, RASQISDYHL, YASQIS, QNGHSFPLT solos o en combinación de los mismos. El péptido o polipéptido funciona similarmente al anticuerpo 8H9 y, por tanto, para los usos de más adelante, este péptido o polipéptido puede usarse similarmente. En una realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el péptido anterior.

Además, la presente invención proporciona un vector que comprende las moléculas de ácidos nucleicos anteriores. La invención también proporciona una célula que comprende el vector anterior. La presente invención proporciona además células que expresan 8H9 o derivado de anticuerpos 8H9.

5 La presente invención proporciona un anticuerpo distinto del anticuerpo monoclonal 8H9 que comprende las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo que puede unirse al mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal 8H9.

10 La presente invención también proporciona una sustancia que puede inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal 8H9. En una realización, la sustancia es un anticuerpo. En otra realización, la sustancia es un péptido.

La presente invención proporciona además un anticuerpo monocatenario aislado de 8H9 o un derivado del mismo. La presente invención también proporciona un scFv aislado del anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo. 15 Los anticuerpos o derivados monocatenarios son conocidos en el campo de los anticuerpos. En una realización, el scFv está directa o indirectamente acoplado a un agente citotóxico. En otra realización, el scFv está ligado a una primera proteína que puede unirse a una segunda proteína que se acopla a un agente citotóxico. Algún fundamento se aplica a los usos de obtención de imágenes del anticuerpo monoclonal 8H9 o su derivado. En el caso de la obtención de imágenes, en lugar de un agente citotóxico, el anticuerpo o su derivado se acoplarán a un agente de obtención de 20 imágenes. Tanto los agentes citotóxicos como de obtención de imágenes se conocen en la técnica.

La presente invención proporciona una célula que comprende scFv de 8H9. En una realización, la célula es un eritrocito. La presente invención también proporciona una célula modificada con el gen scFv de 8H9.

25 La presente invención también proporciona un liposoma modificado por scFv de 8H9. Es una intención de la divulgación administrar 8H9 mediante liposomas o mediante otras tecnologías de administración.

La presente invención proporciona un procedimiento para destruir directamente o administrar fármaco, ADN, ARN o derivados de los mismos a la célula que porta el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 8H9 o para 30 obtener imágenes de células o tumores que portan dicho antígeno usando la célula o liposoma modificado por scFv de 8H9 o scFv de 8H9 aislado.

La presente invención proporciona una proteína con aproximadamente 58 kilodalton de peso molecular que reacciona específicamente con el anticuerpo monoclonal 8H9. Si esta proteína está glucosilada, el peso molecular aparente es aproximadamente 90 kilodalton. 35

La presente invención proporciona un anticuerpo producido por inmunización del antígeno de 8H9 expresado o porción específica del mismo. La porción específica es la región que es reconocida por 8H9. Otra región es la región que realiza su función específica. 40

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de 8H9.

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de 8H9. La molécula de ácido nucleico incluye, pero no se limita a, ADN sintético, ADN genómico, ADNc o ARN. 45

La presente invención también proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de 8H9 o una porción del mismo. La porción podría ser un dominio funcional de dicho antígeno. La presente invención proporciona una célula que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de 8H9. 50

La presente invención proporciona un procedimiento para producir la proteína que se une al anticuerpo monoclonal 8H9 que comprende clonar la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de 8H9 en un vector apropiado, expresar dicha proteína en células apropiadas y la recuperación de dicha proteína expresada. 55

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de anticuerpo usando el antígeno de 8H9 expresado o la porción que es inmunogénica. La presente invención también proporciona un anticuerpo producido por el procedimiento anteriormente descrito. En una realización, el anticuerpo es policlonal. En otra realización, el anticuerpo es uno monoclonal. 60

La presente invención proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de células tumorales que comprende poner en contacto dichas células tumorales con una cantidad apropiada de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo, o el anticuerpo producido usando el antígeno de 8H9 expresado o un derivado del mismo.

65 La presente invención proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad apropiada de anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo, o el anticuerpo producido usando el antígeno de 8H9 expresado o un derivado del mismo.

La presente invención proporciona un procedimiento para obtener imágenes de un tumor en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo monoclonal 8H9 marcado o un derivado marcado, o un anticuerpo marcado producido usando el antígeno de 8H9 expresado o un derivado marcado. En una realización, el anticuerpo o el derivado están marcados con radioisótopo.

La presente invención proporciona un procedimiento de reducción de células tumorales en un sujeto que comprende administrar al sujeto anticuerpo monoclonal 8H9 o un derivado del mismo, o un anticuerpo monoclonal producido usando el antígeno de 8H9 expresado o un derivado del mismo, en el que el anticuerpo o derivado se acopla a un agente citotóxico al sujeto. En una realización, el acoplamiento a un agente citotóxico es indirecto. En otra realización, el acoplamiento es ligando primero directamente el anticuerpo o derivado a una primera proteína que puede unirse a una segunda proteína y la segunda proteína está covalentemente acoplada a un agente citotóxico. En otra realización, el agente citotóxico es un radioisótopo.

La presente invención también proporciona un procedimiento para evaluar el potencial de portar tumores de un sujeto que comprende medir la expresión del antígeno de 8H9 en el sujeto, en el que la expresión aumentada de dicho antígeno indica mayor potencial de portar tumores del sujeto.

La presente invención proporciona un animal transgénico que comprende un gen exógeno que codifica el antígeno de 8H9. El animal transgénico también puede llevar un gen inactivado que codifica el antígeno análogo de ratón de 8H9. En una realización, es un ratón transgénico.

La presente invención proporciona un procedimiento para cribar nuevos compuestos antitumorales que comprende poner en contacto el animal transgénico con el compuesto probado y medir el nivel de expresión del antígeno de 8H9 en dicho animal transgénico, indicando una disminución en el nivel de expresión que el compuesto puede inhibir la expresión del antígeno de 8H9 y que es un candidato antitumoral.

La invención se entenderá mejor mediante referencia a los siguientes detalles, pero aquellos expertos en la materia apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados sólo son ilustrativos y no pretenden limitar la invención como se describe en este documento, que se define por las reivindicaciones que siguen más adelante.

Detalles experimentales

Primera serie de experimentos

Anticuerpo monoclonal 8H9 elige como diana un novedoso antígeno de superficie celular expresado por un amplio espectro de tumores sólidos humanos

Los antígenos de superficie limitados a tumor pueden ser dianas para terapias de diagnóstico e inmunitarias. El anticuerpo monoclonal 8H9 es un hibridoma IgG1 murino derivado de la fusión de células SP2/0 de mieloma de ratón y linfocitos esplénicos de ratones BALB/c inmunizados con neuroblastoma humano. Por inmunohistoquímica, el 8H9 era altamente reactivo con tumores cerebrales humanos, sarcomas infantiles, neuroblastomas y menos con adenocarcinomas. Entre los tumores cerebrales primarios, 15/17 glioblastomas, 3/4 gliomas mixtos, 4/11 oligodendrogliomas, 6/8 astrocitomas, 2/2 meningiomas, 3/3 schwannomas, 2/2 meduloblastomas, 1/1 neurofibroma, 1/2 tumores neurogliales, 2/3 ependimomas y 1/1 pineoblastoma dieron positivo. Entre los sarcomas, 21/21 Ewing/PNET, 28/29 rabdomiosarcomas, 28/29 osteosarcomas, 35/37 tumores desmoplásicos de células redondas pequeñas, 2/3 sarcomas sinoviales, 4/4 leiomiomas, 1/1 histiocitoma fibroso maligno y 2/2 sarcomas no diferenciados dieron positivo con 8H9. 87/90 neuroblastomas, 12/16 melanomas, 3/4 hepatoblastomas, 7/8 tumores de Wilm, 3/3 tumores rabdoideos y 12/27 adenocarcinomas también dieron positivo. A diferencia, el 8H9 no fue reactivo con tejidos normales humanos que incluyen médula ósea, colon, estómago, corazón, pulmón, músculo, tiroides, testículos, páncreas y cerebro humano (lóbulo frontal, cerebelo, protuberancia y médula espinal). La reactividad con tejido de mono cinomolgo normal fue similarmente limitada. La inmunofluorescencia indirecta localizó el antígeno reconocido por 8H9 en la membrana celular. El antígeno es sensible a proteinasa y no está fácilmente modulado por la superficie celular. El 8H9 inmunoprecipitó una banda de 58 kD tras el tratamiento con N-glucanasa, lo más probable una proteína con grado heterogéneo de glucosilación. Este novedoso sistema anticuerpo-antígeno puede tener posibilidades de elegir como diana tumores.

Los anticuerpos monoclonales tales como 3F8 (1) y 14.18 (2) contra G_{D2} en neuroblastoma, M195 contra CD33 en leucemia aguda (3), anticuerpos dirigidos contra HER2 en cáncer de mama (4) y anticuerpos dirigidos contra CD20 en linfoma (5) han mostrado eficacia en ensayos clínicos recientes. El pronóstico en tumores cerebrales de la glía y tumores metastásicos, mesenquimatosos y neuroectodérmicos sigue siendo pésimo a pesar de las innovaciones en quimioterapia y radioterapia. La inmunoterapia puede ofrecer nuevas posibilidades para mejorar el resultado en estos pacientes.

Los antígenos tumorales expresados en la membrana celular son posibles dianas en inmunoterapia. Ejemplos de antígenos tumorales expresados en tumores de la glía incluyen moléculas de adhesión de células neurales (6), gangliosidos tales como G_{D2} y G_{M2} (7) y antígenos neurohematopoyéticos (8). Las recientes investigaciones se han centrado en receptores de factores de crecimiento como inmunodianas, en particular el receptor del factor de crecimiento epi-

dérmico mutante de tipo III (EGFRvIII) que se ha mostrado que se expresa en el 50% de los tumores cerebrales de la glía (9). A pesar de la expresión universal de NCAM por células neuronales, dos estudios clínicos han utilizado anticuerpos dirigidos contra NCAM en pacientes. Se mostró que el mAb UJ13A se acumulaba localmente en gliomas en virtud de la alteración de la barrera hematoencefálica (10) y se usó otro anticuerpo, ERIC-1, en un entorno terapéutico en cavidades de glioma reseccionadas con algún beneficio clínico (11).

Estudios recientes han elegido como diana inmunoterapia para la matriz extracelular alrededor de células tumorales. Se ha informado que la tenascina se expresa en el 50-95% de los tumores cerebrales de la glía, además de en tumores mesenquimatosos, carcinomas y células de la glía, de hígado y de riñón humanas normales (12). Recientemente se ha informado que anticuerpos monoclonales dirigidos contra tenascina 81C6 (13) y BC-2 y BC-4 (14) administrados de forma intracavitaria muestran eficacia en el tratamiento de pacientes con gliomas malignos. Sin embargo, como estos antígenos también están presentes a grados variables en células neurales y no neurales humanas normales, su utilidad clínica dependería de su expresión en exceso por tumores cerebrales cuando se compara con tejidos normales. Con la excepción de EGFRvIII, los antígenos de los tumores de la glía descritos hasta la fecha se encuentran generalmente en tejido cerebral normal, o están limitados a compartimentos intracelulares, por tanto, con utilidad clínica limitada para la elección como diana de anticuerpos.

Los antígenos de membrana que han sido elegidos como diana en osteosarcoma incluyen G_{D2} (15), CD55 (16) y un antígeno asociado a osteosarcoma aún sin definir reconocido por los MoAb TP-1 y TP-3 (17). Sin embargo, estos antígenos están presentes a grados variables en tejidos normales. Similarmente, la glicoproteína p 30/32 codificada por el oncogén MIC2 y reconocida por el anticuerpo monoclonal 013 en la familia de tumores de Ewing se expresa en tejidos normales (18). En rhabdomyosarcoma, la familia MyoD de proteínas oncofetales es de localización nuclear (19) y, por tanto, inaccesible a inmunoterapia que elige como diana anticuerpos.

Un antígeno tumoral ideal para la inmunoterapia de elección de diana estaría ausente en tejidos normales y se expresaría abundantemente en la superficie celular de tumores. Tales antígenos específicos de tumor, por ejemplo, idiotipos en linfoma de linfocitos B, son raros (20). Además, un antígeno específico de tumor "genérico" expresado en células tumorales de linaje variable reconocidas por anticuerpos monoclonales puede tener utilidad más amplia en estrategias basadas en anticuerpos. Los inventores describen aquí un antígeno asociado a tumor novedoso reconocido por un anticuerpo monoclonal murino 8H9 expresado en membranas celulares de un amplio espectro de tumores de origen neuroectodérmico, mesenquimatoso y epitelial, con distribución limitada en tejidos normales.

Materiales y procedimientos

Muestras de tejido tumoral y normal

Se analizaron tumores congelados de 330 pacientes con neoplasia neuroectodérmica, mesenquimatoso y epitelial. Todos los diagnósticos de muestras tumorales se confirmaron por evaluación con hematoxilina y eosina de especímenes incorporados en parafina. También se analizaron 15 muestras de tejido humano normal y 8 muestras de tejido de monocinólogo normal obtenidas en la autopsia.

Líneas celulares

Se proporcionaron líneas celulares de neuroblastoma humano LAN-1 del Dr. Robert Seeger, Hospital infantil de Los Ángeles, Los Ángeles, CA. Las líneas celulares de neuroblastoma humano LA-15-N, LA-66-N, LA-5S, LA-19-S y LA-19-N fueron proporcionadas por el Dr. Robert Ross (Universidad de Fordham, NY) y IMR 32 y NMB7 por el Dr. Shuen-Kuei Liao (Universidad de McMaster, Ontario, Canadá). Las líneas celulares de carcinoma de mama SW480 y ZR75-1 fueron proporcionadas por el Dr. S. Welt (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY) y la línea de melanoma SKMe128 por el Dr. P. Chapman (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY). Las líneas celulares de neuroblastoma SKNHM, SKNHB, SKNJD, SKNLP, SKNER, SKNMM, SKNCH y SKNSH, la línea celular de rhabdomyosarcoma SKRJc y las líneas celulares de Ewing/PNET SKPPR, SKPRT y SKNMC se derivaron de pacientes con enfermedad metastásica tratada en MSKCC. Las siguientes líneas celulares se compraron de la Colección americana de cultivos tipo, Bethesda, MD: líneas celulares de melanoma HTB63 y HTB67, línea celular de rhabdomyosarcoma HTB82, línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas HTB 119, línea de leucemia aguda de linfocitos T Jurkat, línea de células multiformes de glioblastoma Glio72, línea celular de cáncer de mama HTB 22, línea celular de carcinoma de colon SK Co-1, Hela, riñón embrionario 293 y líneas de células de osteosarcoma CRL1427, HTB86 y HTB 96. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en un incubador con 6% de CO₂ usando medio de cultivo patrón que estaba constituido por medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Se compraron hepatocitos humanos normales de Clonetics, San Diego, CA, y se procesaron inmediatamente tras la entrega. Se prepararon células mononucleares humanas normales a partir de muestras de médula ósea heparinizadas por centrifugación a través de un gradiente de separación de densidad en Ficoll-Hypaque. Las líneas de células linfoblastoides EBV se derivaron de células mononucleares humanas.

Anticuerpo monoclonal

Se hiperinmunizaron ratones BALB/c hembra con neuroblastoma humano según procedimientos previamente explicados resumidamente (21). Los linfocitos derivados de estos ratones se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón SP2/0. Los clones se seleccionaron para la unión específica en ELISA. El hibridoma de 8H9 que secretaba un anticuerpo monoclonal IgG₁ se seleccionó para la caracterización adicional después de la subclonación.

Estudios inmunohistoquímicos

Ocho μm de secciones de tumores congeladas en criostato se fijaron en acetona y se lavaron en PBS. Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron como se describe previamente (22). Las peroxidasas endógenas se bloquearon en H_2O_2 al 0,3% en PBS. Las secciones se incubaron en suero de caballo al 10% (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) después de bloquearse con avidina y biotina. La incubación con 8H9 purificado (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en PBS se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se usó mieloma de IgG1 como control (Sigma Chemical, St Louis, MO). Las secciones se incubaron con un anticuerpo biotinilado de caballo secundario dirigido contra IgG de ratón (Vector Laboratories, Burlingame, CA) seguido de incubación con complejo ABC (Vector) y se revelaron con el kit de sustrato de peroxidasa Vector VIP o de sustrato de peroxidasa DAB (Vector). Se usó una contratinción de hematoxilina al 10% durante 4 minutos. La tinción se clasificó como positiva o negativa y se observó reactividad homogénea o heterogénea.

Inmunofluorescencia indirecta

Se lavaron 1 millón células diana en PBS y luego se centrifugaron a $180 \times g$ durante 5 min. Entonces, los sedimentos se hicieron reaccionar con 100 μl de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 8H9 a 4°C durante 1 hora. Después de lavar las células con PBS se dejaron reaccionar con 100 μl de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón de F(ab')_2 conjugada con FITC + IgM (Biosource International, Camarillo, CA) a 4°C. El análisis de citometría de flujo se realizó usando el inmunocitómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA).

Con el fin de estudiar la pérdida de antígeno después de la unión a 8H9, se prepararon 10^6 sedimentos de células NMB7 y U2OS como antes y cada uno se hizo reaccionar con 100 μl de 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 8H9 o el anticuerpo dirigido contra HLA A,B,C, HB-95 (Colección americana de cultivos tipo, Bethesda, MD) a 4°C durante 1 hora. Las células NMB7 también se hicieron reaccionar similarmente con el anticuerpo monoclonal dirigido contra G_{D2} 3F8. Después de lavar con PBS, las células se cultivaron a 37°C en medio de cultivo patrón durante 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h. Entonces, se hicieron reaccionar con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón de F(ab')_2 de anticuerpo secundario conjugada con FITC + IgM (Biosource International, Camarillo, CA) a 4°C. Se realizó el análisis de citometría de flujo. La inmunofluorescencia media geométrica se comparó con la de células de control incubadas durante intervalos de tiempo similares en medio de cultivo patrón en ausencia de MoAb, y luego se inmunotizó con HB-95 (U2OS) o 3F8 (NMB7).

La sensibilidad del antígeno por proteinasa se probó incubando $0,5 \times 10^6$ células HTB82, U2OS y NMB7 a 37°C durante 30 minutos en RPMI con concentraciones crecientes de proteinasa neutra, Pronase E de *Streptomyces griseus* (E. Merck, Darmstadt, Alemania). Después de lavar, las células se tiñeron con 8H9 o 3F8 y se estudiaron por inmunofluorescencia indirecta.

Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se llevó a cabo usando una modificación de la técnica convencional. Se usaron (23) líneas celulares positivas para 8H9 (NMB7, LAN-1, HTB82, U2OS, HELA, 293) y líneas celulares negativas para 8H9 (Jurkat, HTB119). Se lavaron 2×10^7 células viables en TBS (Tris-HCl 0,05 M, pH 8, con NaCl 0,15 M) y se incubaron con 10 U de lactoperoxidasa (Sigma), 100 μl de 100 U/ml en TBS, 1 mCi de ^{125}I (2,7 μl) y 1/6000 dilución de peróxido de hidrógeno al 30% durante 5 min a 20°C. Se añadieron cinco unidades de lactoperoxidasa (50 μl) y la misma dilución de peróxido de hidrógeno (50 μl) cada 3 min con agitación durante un total de 3 veces. Las células se lavaron exhaustivamente en TBS que contenía 2 mg/ml de NaI. Las células yodadas se lavaron tres veces en TBS, se lisaron sobre hielo (30 min) en 500 μl de tampón RIPA modificado (Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2, NaCl 0,15 M, desoxicolato de sodio al 1%, Nonidet P-40 al 1%, dodecilsulfato de sodio al 0,1% (SDS), EDTA 0,01 M) que contenía inhibidores de proteasa (PMSF 1 mM, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bestatina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, 0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de E-64). Los lisados se clarificaron por centrifugación a 15.000 rpm durante 5 min a 4°C, luego se incubaron con 1 mg de 8H9 o anticuerpo de control IgG1 durante 16 h a 4°C con mezclado. El inmunocomplejo se recogió por adsorción sobre 100 μl de perlas de proteína G-Sepharose (Sigma) durante 6 h a 4°C. El inmunocomplejo inmovilizado sobre proteína G se lavó tres veces con tampón RIPA modificado, y luego se lavó una vez con tampón RIPA que contenía NaCl 1 M, y luego dos veces con tampón TNN modificado (Tris-HCl 0,05 M, pH 8, NaCl 0,15 M, Nonidet P-40 al 0,05%). Las proteínas unidas se eliminaron por elución con SDS-tampón de muestra y se analizaron por SDS al 7,5%-PAGE, seguido de autorradiografía. Las desglucosilación del antígeno radiomarcado

ES 2 357 425 T3

se llevó a cabo sobre la proteína G-Sepharose usando N-glucanasa (Glyco, Novato, CA) y O-glucanasa (Glyco) según instrucciones del fabricante. El peso molecular se estimó usando el software Quantity One de BioRad Inc. (Hercules, CA).

Resultados

Estudios inmunohistoquímicos

Se analizaron secciones congeladas de 330 tumores con diagnósticos histológicamente confirmados de cáncer para inmunorreactividad con mAb 8H9 (Tablas 1, 2). También se analizaron 15 tejidos humanos histológicamente normales y 8 tejidos de mono normales (Tabla 3).

TABLA 1

Reactividad con 8H9: tumores neuroectodérmicos

Tumores	Nº	Positivo para 8H9	%
Neuroblastoma	90	87	97
Tumores cerebrales			
1. Tumores de la glía			
Glioblastoma multiforme	17	15	88
Glioma mixto	4	3	-
Oligodendroglioma	11	4	36
Astrocitoma	8	6	75
Ependimoma	3	2	-
2. PNET primitivo			
Meduloblastoma	2	2	-
3. Mixto			
Tumor neuroglial	2	1	-
4. Otros			
Schwannoma	3	3	-
Meningioma	2	2	-
Neurofibroma	1	1	-
Pineoblastoma	1	1	-
Melanoma	16	12	75
Familia de tumores de Ewing	21	21	100
TOTAL	181	160	88

TABLA 2

Reactividad con 8H9: Tumores mesenquimatosos, epiteliales y otros

A. Mesenquimatosos

Tumores	Nº	Reactivo con 8H9	%
Rabdomiosarcoma	29	28	97
Osteosarcoma	29	28	97
Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas	37	35	95
Leiomiomasarcoma	4	4	-
Sarcoma sinovial	3	2	-
Histiocitoma fibroso maligno	1	1	-
Sarcoma sin diferenciar	2	2	-
Fibrosarcoma	1	0	-
TOTAL	106	100	94

B. Epiteliales

Tumores	No.	Reactivo con 8H9	%
Mama	12	4	33
Vejiga	4	1	-
Suprarrenal	3	1	-
Estómago	1	1	-
Próstata	2	1	-
Colon	1	1	-

ES 2 357 425 T3

<u>Tumores</u>	<u>No.</u>	<u>Reactivo con 8H9</u>	<u>%</u>
Pulmón	1	1	-
Endometrio	1	1	-
Cuello del útero	1	1	0
Renal	1	1	-
TOTAL	27	12	44

Resumen de tumores epiteliales				
Nº	Portaobjetos	Fecha	Diagnóstico	8H9
1	7251	3/11/98	Cáncer de mama	neg
2	7279	3/13/98	Cáncer de mama	neg
3	7282/7601	3/13/1998; 10/5/98	Cáncer de mama	neg
4	7722	10/21/98	Cáncer de mama	NE(no células)
5	7261	3/11/98	Cáncer de mama	pos
6	6388	8/26/98	Cáncer de mama	pos
7	6493	10/11/98	Cáncer de mama	neg
8	6498	10/11/98	Cáncer de mama	neg
9	6499	10/11/98	Cáncer de mama	neg
10	6492	10/11/98	Cáncer de mama	neg
11	6376	8/26/96	Cáncer de mama	pos
12	6488	10/11/98	Cáncer de vejiga	neg
13	6489	10/11/98	Cáncer de vejiga	Débilmente +
14	6490	10/11/98	Cáncer de vejiga	neg
15	6491	10/11/98	Cáncer de vejiga	neg
16	6441	9/30/98	Cáncer de pulmón	pos
17	6503	10/11/98	Cáncer de próstata	neg
18	6504	10/11/98	Cáncer de próstata	pos
19	6501	10/11/98	Cáncer de cuello del útero	neg
20	6502	10/11/98	Cáncer de útero	pos
21	7717	10/21/98	Cáncer suprarrenal	neg(necrótico)
22	7250	3/11/98	Cáncer suprarrenal	neg
23	7207	11/18/97	Cáncer renal	pos
24	6505	10/11/98	Cáncer de estómago	pos
25	7886	2/22/99	Cáncer suprarrenal	pos
35	Total	Evaluable	Positivo para 8H9	
	Mama	11	103 de 10	
	Vejiga	4	41 de 4	
	Próstata	2	21 de 2	
	Suprarrenal	3	21 de 2	
40	Renal	1	11 de 1	
	Estómago	1	11 de 1	
	Uterino	1	11 de 1	
	Cuello del útero	1	10 de 1	
	Pulmón	1	11 de 1	
45	TOTAL	25	2310 de 23	

C. Otros tumores			
<u>Tumores</u>	<u>Nº</u>	<u>Reactivo con 8H9</u>	<u>%</u>
Hepatoblastoma	4	3	-
Tumor de Wilm	8	7	-
Tumor rabdoide	3	3	-
Paraganglioma	1	1	-
TOTAL	16	14	88

TABLA 3

Reactividad con 8H9 en tejidos humanos y de mono cinomolgo normales

5	A. Humano	
	Tejidos	Reactividad con 8H9
10	Lóbulo frontal	Negativa
	Protuberancia	Negativa
	Médula espinal	Negativa
	Cerebelo	Negativa
15	Pulmón	Negativa
	Corazón	Negativa
	Músculo esquelético	Negativa
	Tiroides	Negativa
20	Testículos	Negativa
	Páncreas	Tinción citoplásmica*
	Corteza suprarrenal	Tinción citoplásmica*
	Hígado	Tinción citoplásmica*
25	Colon sigmoide	Negativa
	Médula ósea	Negativa
	Riñón	Negativa
B. Mono cinomolgo		
25	Tejidos	Reactividad con 8H9
	Cerebelo	Negativa
30	Lóbulo frontal	Negativa
	Corteza occipital	Negativa
	Tronco encefálico	Negativa
	Hígado	Tinción citoplásmica
35	Estómago	Negativa
	Corteza suprarrenal	Tinción citoplásmica
	Riñón	Negativa
* antecedentes no específicos		

35 La tinción citoplásmica no específica heterogénea se notó en páncreas, estómago, hígado y corteza suprarrenal humanos normales que disminuyó cuando se usaron fragmentos F(ab')₂ de 8H9 en lugar del anticuerpo completo para la inmunotinción (datos no mostrados). Ninguno de los otros tejidos humanos mostró reactividad con 8H9. En particular, secciones de tejido cerebral humano normales que incluían lóbulo frontal, médula espinal, protuberancia y cerebelo fueron completamente negativas. Los tejidos normales de mono cinomolgo también demostraron reactividad

40 similarmente limitada con tinción no específica observada en estómago e hígado. (Tabla 3).

La mayoría de los tumores neuroectodérmicos y mesenquimatosos probados mostraron reactividad positiva con 8H9, tumores epiteliales a un menor grado. La inmunorreactividad con 8H9 se observó en una distribución de membrana celular característica homogénea en 286 de las 330 (87%) muestras tumorales examinadas (Figura 1). El 88% de los tumores neuroectodérmicos, el 94% de los tumores mesenquimatosos y el 44% de los tumores epiteliales dieron

45 positivo con 8H9. (Tablas 2, 3).

Inmunofluorescencia indirecta

50 La inmunorreactividad con 8H9 en 35 líneas de células de neuroblastoma, melanoma, rabdomiosarcoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, osteosarcoma, glioblastoma, leucemia, cáncer de mama y cáncer de colon se probó usando inmunofluorescencia indirecta. Se detectó reactividad de la membrana celular de moderada a fuerte con 8H9 en 16/16 líneas celulares de neuroblastoma, 3/3 líneas celulares de melanoma, 2/2 líneas celulares de rabdomiosarcoma, 1/1 línea de células multiformes de glioblastoma, 3/3 líneas celulares de cáncer de mama y 1/1 línea celular de cáncer

55 de colon estudiadas. 2 de 3 líneas celulares de Ewing/PNET y 2 de las 3 líneas celulares de osteosarcoma fueron fuertemente positivas, mientras que las otras mostraron una débil positividad. La línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas dio negativo con 8H9 al igual que la línea celular Jurkat T-ALL y las células linfoblastoides transformadas con EBV. Las células mononucleares de médula ósea humana normal y los hepatocitos no tuvieron reactividad con 8H9. (Tabla 4) En las líneas celulares de neuroblastoma estudiadas, la inmunofluorescencia indirecta

60 con 8H9 fue más débil (fluorescencia media: 73,73; control negativo: 3,95) cuando se comparó con el anticuerpo dirigido contra G_{D2} 3F8 (fluorescencia media: 249,95).

La unión de 8H9 a U2OS como se detecta por inmunofluorescencia indirecta no se redujo significativamente después de 48 h de incubación a 37°C. Durante el mismo periodo, la unión al anticuerpo dirigido contra HLA HB-95 disminuyó el 89%. Similarmente, no hubo pérdida significativa de la unión de 8H9 a células NMB7, mientras que la

65 unión de 3F8 disminuyó el 61%. (Figura 2).

ES 2 357 425 T3

Hubo una reducción dependiente de la dosis de Pronase en la reactividad con 8H9 con pérdida del 75-85% de inmunofluorescencia lograda a una concentración de Pronase final de 0,3 mg/ml (Figura 3). No hubo pérdida apreciable de la reactividad con 3F8 en células NMB7. Además, el antígeno de 8H9 no fue sensible a neuraminidasa o fosfolipasa C específica de fosfatidil-inositol (datos no mostrados).

TABLA 4

Reactividad con 8H9 con líneas celulares por inmunofluorescencia indirecta

	<u>Línea celular</u>	<u>Reactividad con 8H9</u>
1. Neuroblastoma		
	LAN-1	positiva
	NMB7	positiva
	LA-1-15-N	positiva
	LA-1-66N	positiva
	IMR32	positiva
	LA-1-19N	positiva
	LA-1-5S	positiva
	LA-1-19S	positiva
	SKNHM	positiva
	SKNSH	positiva
	SKNHB	positiva
	SKNJD	positiva
	SKNLP	positiva
	SKNMM	positiva
	SKPCH	positiva
	SKNER	positiva
2. Melanoma		
	HTB63	positiva
	HTB67	positiva
	SKMe128	positiva
3. Rabdomiosarcoma		
	HTB 82	positiva
	SKRJJC	positiva
4. Cáncer de pulmón de células pequeñas		
	HTB119	negativa
5. Osteosarcoma		
	CRL1427	positiva
	HTB96	positiva
	HTB86	positiva
6. Ewing/PNET		
	SKPPR	positiva
	SKPRT	positiva
	SKNMC	positiva
7. Glioblastoma		
	Glio72	positiva
8. Carcinoma de mama		
	ZR75-1	positiva
	SW480	positiva
	HTB22	positiva
9. Carcinoma de colon		
	SKCo-1	positiva
10. Leucemia		
	Jurkat	negativa
11. Células humanas normales		
	Médula ósea	negativa
	Hepatocitos	negativa
12. Células linfoblastoides EBV		negativa

Inmunoprecipitación

El 8H9 inmunoprecipitó una amplia banda centrada en aproximadamente 90 kD de todas las líneas celulares positivas para 8H9 (HTB82, NMB7, LAN1, U2OS, Hela, 293) usando condiciones tanto nativas como reductoras (2ME) (datos no mostrados). Ni el anticuerpo IgG1 de control ni las líneas celulares negativas para 8H9 (Jurkat o HTB119) mostraron el antígeno de 90 kD. Tras el tratamiento con N-glucanasa se encontró una única banda de 58 kD. La O-glucanasa no tuvo efecto. Los inventores interpretaron que esto significaba una proteína con un modelo de glucosilación heterogénea, sin subunidades ligadas por disulfuro.

Discusión

Los inventores describen un novedoso antígeno tumoral de superficie de 58 kD que se detecta por el anticuerpo monoclonal 8H9. Este antígeno se expresa en un amplio espectro de tumores neuroectodérmicos, mesenquimatosos y epiteliales humanos y parece ser inmunohistoquímicamente específico de tumor, concretamente se expresa en membranas celulares de células tumorales sin/con baja reactividad de membrana observada en tejidos humanos normales. El antígeno estaba presente en el 88% de los tumores neuroectodérmicos, el 96% de los tumores mesenquimatosos y el 44% de los cánceres epiteliales probados. La distribución de tejido específica sugiere un único antígeno tumoral no previamente informado.

La expresión del antígeno de 8H9 en varios tumores cerebrales de la glía y no de la glía y la ausencia completa en tejido cerebral normal es inusual. Esta propiedad contrasta con la mayoría de los antígenos de tumores de la glía previamente descritos con una distribución de membrana celular (Tabla 5). Los antígenos neuroectodérmicos-oncofetales, por ejemplo, moléculas de adhesión de células neurales, están presentes a grados variables en tejidos adultos y fetales normales (6). Los antígenos neurohematopoyéticos que incluyen determinantes Thy-1 (24), CD-44 (8) y sus variantes de corte y empalme (25) están presentes en tejido cerebral normal y neoplásico, además de en tejidos hematopoyéticos, principalmente de linaje linfoide. Gangliósidos tales como G_{D2} y G_{M2}, aunque se expresan en tumores de origen neuroectodérmico, también están presentes en tejido cerebral normal (7). La serie de lactotetraosa gangliósido 3'-6''-iso L_{D1} se expresa ampliamente en tumores cerebrales y en cánceres epiteliales y tumores de células germinales, además de en tejido cerebral normal (26).

TABLA 5

Antígenos expresados en tumores de la glía

Antígeno	Anticuerpo	Reactividad cruzada con tejidos normales
Antígenos de la membrana celular		
Antígenos neurohematopoyéticos		
Thy-1	Ab 390 (24)	Células neuronales normales
CD44	Múltiple	Endotelio normal
Variantes de corte y empalme de CD44	Múltiple (25)	Células neuronales normales
Moléculas de adhesión de células		
NCAM	ERIC-1 (11), UJ13-A (10)	Células neuronales normales
Integrina 3	ONS-M21 (30)	Células neuronales normales
Gangliósidos		No reactivo con cerebro normal
G _{D2}	3F8 (35)	Células neuronales normales
3'-6' iso-LD1	DMAb-22 (29)	Cerebro fetal, astrocitos reactivos
Receptores de factores de crecimiento		
EGFRvIII	MR1 (9)	Tejidos no normales; carcinoma de mama y de pulmón
PDGFR-	Dirigido contra PDGFR-7 (36)	Células neuronales normales
Sin caracterizar		
Asociados a ependimoma	MabEp-C4 (34)	No reactivo con PBL, cerebro normal
Asociados a glioma	GA-17, GB-4, GC-3 (32)	No reactivo con cerebro adulto o fetal normal
Asociados a glioma	6DS1 (33)	No reactivo con cerebro adulto o fetal normal

	Antígeno	Anticuerpo	Reactividad cruzada con tejidos normales
5	<u>Intracelular</u> IFAP-300	Dirigido contra IFAP-300 kDa (37)	No reactivo con cerebro normal
	GFAP	Múltiple	Células neuronales normales
10	<u>Matriz intersticial</u> Tenascina	81C6 (13), BC-2 (14)	Hígado normal, riñón; no reactivo con cerebro adulto, no reactivo con cerebro normal
	GP-240	Mel-14 (38)	Melanoma; no reactivo con cerebro normal
15	Fibronectina oncofetal	BC-1 (39)	Endometrio adulto; no reactivo con cerebro normal

Otra propiedad notable del antígeno de 8H9 es su expresión en tumores de diverso linaje: tumores neuroectodérmicos, mesenquimatosos y a un menor grado epiteliales. Hasta la fecha, ningún anticuerpo monoclonal tiene el espectro de unión descrito con 8H9. Esta amplia distribución proporcional a MoAb 8H9 la posibilidad de ser un antígeno tumoral “genérico” para terapia que elige diana. De particular interés es su expresión en 28/29 tumores de rabdomiosarcoma y las líneas celulares de rabdomiosarcoma probadas por inmunofluorescencia indirecta. Los rabdomiosarcomas diseminados y de alto riesgo tienen un mal pronóstico con < 40% de tasa de supervivencia a largo plazo (27). Aunque la familia MYOD de proteínas oncofetales son específicas para rabdomiosarcoma, son antígenos nucleares y, por tanto, candidatos poco probables para terapia basada en anticuerpos (19). En un informe preliminar se describió la reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal BW575 producido contra carcinoma de pulmón de células pequeñas con líneas celulares de rabdomiosarcoma y 2/2 secciones de rabdomiosarcoma. Sin embargo, este anticuerpo mostró reactividad cruzada con tejidos normales (28).

Dos grupos adicionales de tumores estudiados fueron la familia de tumores de Ewing y osteosarcoma. La familia de tumores de Ewing puede diferenciarse de otros tumores de células redondas azules pequeñas de la infancia por anticuerpos monoclonales que reconocen la glucoproteína p30/32 codificada por el oncogén MIC2. Sin embargo, esta proteína también se expresa en tejidos normales y en otros tumores, limitando seriamente su utilidad en la obtención de imágenes por rayos X y terapia (18). El 100% (21/21) de los tumores de la familia de Ewing probados mostró inmunorreactividad con el MoAb 8H9. Aparte de G_{D2} (15), el antígeno asociado a osteosarcoma reconocido por los MoAb TP-1 y TP-3 (17), y el factor acelerador de la degradación CD55 (16), pocos antígenos asociados a tumores se han definido para osteosarcoma. En el estudio de los inventores, 28/29 (95%) osteosarcomas probados fueron inmunohistoquímicamente positivos con MoAb 8H9. Por tanto, esto último puede tener utilidad clínica en la familia de tumores de Ewing y osteosarcomas.

El antígeno de 8H9 parece ser un antígeno novedoso previamente no descrito. La sensibilidad por proteinasa sugiere que tiene un componente de proteína. Por el contrario, la falta de sensibilidad por neuraminidasa implica la ausencia de restos de ácido siálico, y la falta de sensibilidad por fosfolipasa C específica de fosfatidil-inositol implica que el antígeno de 8H9 no está anclado a GPI. Es poco probable que esté relacionado con la familia de las moléculas de adhesión de células neurales debido a su distribución única y la restricción de expresión entre tejidos normales (6). De los anticuerpos actualmente descritos que se unen a tumores de la glía se ha informado que cuatro están limitados a tejidos tumorales. Se encontró que el EGFRvIII mutado se expresaba en el 52% de los gliomas probados y reacciona de forma cruzada con carcinomas de mama y de pulmón (29). Sin embargo, la amplia distribución del antígeno de 8H9 es diferente de EGFRvIII. La integrina 3, una proteína de 140 kDa expresada en gliomas y meduloblastomas, es elegida como diana por el anticuerpo monoclonal ONS-M21 que no reacciona de forma cruzada con cerebro normal (30). Sin embargo, se ha informado de inmunorreactividad negativa con neuroblastoma, melanoma y meningioma (31). Se han publicado datos similares en anticuerpos específicos de glioma sin reactividad cruzada con cerebro normal. Sin embargo, no reaccionan con otros tumores neuroectodérmicos o mesenquimatosos y los datos referentes a la reactividad con otros tejidos no están disponibles (32). El anticuerpo 6DS1 ha elegido como diana un antígeno de 38 kDa en células de glioblastoma. No se ha informado de reactividad cruzada con cerebro humano. Se desconocen datos referentes a la reactividad con otros tejidos humanos, aunque se ha informado de una alta acumulación del anticuerpo radiomarcado en riñón de ratón (33). También se ha descrito un antígeno de proteína específica de ependimoma de 81 kDa reconocido por anticuerpos monoclonales que no reaccionan de forma cruzada con células de la glía normales. Estos anticuerpos no reaccionan con otros tumores de la glía tales como glioblastoma y no se conoce la reactividad cruzada con otro tejido tumoral (34).

La expresión homogénea del antígeno de 8H9 en la membrana celular hace que sea un candidato atractivo para la inmunoterapia de elección de diana. Además, la persistencia del antígeno de 8H9 en células NMB7 después de la unión a MoAb sugiere que el antígeno no está fácilmente inmunomodulado. Con el fin de explorar las posibilidades de obtención de imágenes por rayos X, los inventores usaron 8H9 conjugado con ^{99m}Tc para obtener imágenes de xenoinjertos de neuroblastoma en ratones sin pelo atímicos. Esto reveló captación selectiva en los xenoinjertos, aparte de

captación moderada en el hígado, siendo el % de DI/g el 50% del logrado con el anticuerpo monoclonal dirigido contra G_{D2} 3F8 (datos no mostrados). Por tanto, el derivado de hidrazino de 8H9 conserva las propiedades inmunorreactivas del anticuerpo sin modificar y puede ser útil para la obtención de imágenes por rayos X de tumores. Los inventores también han demostrado radioinmunolocalización selectiva de xenoinjertos de rhabdomyosarcoma en ratones atímicos sin captación significativa en tejidos normales usando 8H9 marcado con ¹²⁵I (datos no mostrados).

En resumen, el anticuerpo monoclonal 8H9 reconoce un antígeno de 58 kD único específico de tumor con amplia distribución a través de un espectro de tumores de linaje variable: neuroectodérmico, mesenquimatoso y epitelial, con expresión limitada en tejidos normales. El 8H9 puede tener utilidad clínica en la terapia de elección como diana de estos tumores sólidos humanos *in vitro* o *in vivo*. Se garantiza una caracterización bioquímica adicional del antígeno de 8H9 y puede ser de interés en la delineación de una posible función en el proceso oncogénico.

Referencias

1. **Cheung, N. K. V., Kushner, B. H., Cheung, I. Y., Canete, A., Gerald, W., Liu, C., Finn, R., Yeh, S. J., Larson, S. M.** Anti-GD2 antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. *J. Clin. Oncol.*, 16:3053-3060, 1998.
2. **Yu, A., Uttenreuther-Fischer, M., Huang, C.-S., Tsui, C., Gillies, S., Reisfeld, R., Kung, F.** Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J. Clin. Oncol.*, 16:2169-2180, 1998.
3. **Jurcic, J. G., Caron, P. C., Miller, W. H., Yao, T. J., Maslak, P., Finn, R. D., Larson, S. M., Warrell, R. P. J., Scheinberg, D. A.** Sequential targeted therapy for acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anti-CD33 monoclonal antibody M195. *Leuk.*, 9:244-248, 1995.
4. **Pegram, M. D., Slamon, D. J.** Combination chemotherapy with trastuzumab (Herceptin) and cisplatin for chemoresistant metastatic breast cancer: evidence for receptor-enhanced chemosensitivity. *Semin. Oncol.*, 26:89-95, 1999.
5. **Czuczman, M. S., Grilo-Lopez, A. J., White, C. A., Saleh, M., Gordon, L., LoBuglio, A. F., Jonas, C., Klippenstein, D., Dallaire, B., Varns, C.** Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J. Clin. Oncol.*, 17:268-276, 1999.
6. **Garin-Chesa, P., Fellingner, E. J., Huvos, A. G., Beresford, H. R., Melamed, M. R., Triche, T. J., Rettig, W. J.** Immunohistochemical analysis of neural cell adhesion molecules. Differential expression in small round cell tumors of childhood and adolescence. *Am. J. Pathol.*, 139:275-286, 1991.
7. **Ritter, G., Livingston, P. O.** Ganglioside antigens expressed by human cancer cells. *Semin. Cancer Biol.*, 2:401-409, 1991.
8. **Ylagan, Quinn, L. R. B.** CD44 expression in astrocytic tumors. *Modern Pathology*, 10:1239-1246, 1997.
9. **Kuan, C. T., Reist, C. J., Foulon, C. F., Lorimer, I. A., Archer, G., Pegram, C. N., Pastan, I., Zalutsky, M. R., Bigner, D. D.** 125I-labeled anti-epidermal growth factor receptor vIII single-chain Fv exhibits specific and high-level targeting of glioma xenografts. *Clin. Can. Res.*, 5:1539-1549, 1999.
10. **Richardson, R. B., Davies, A. G., Bourne, S. P., Staddon, G. E., Jones, D. H., Kemshead, J. T., Coakham, H. B.** Radioimmunolocalization of human brain tumors. Biodistribution of radiolabelled monoclonal antibody UJ13A. *Eur J Nucl Med*, 12:313-320, 1986.
11. **Papanastassiou, V., Pizer, B. L., Coakham, H. B., Bullimore, J., Zananiri, A., Kemshead, J. T.** Treatment of recurrent and cystic malignant gliomas by a single intracavitary injection of 131I-monoclonal antibody: Feasibility, pharmacokinetics and dosimetry. *Br. J. Cancer*, 67:144-151, 1993.
12. **Celis, E., Tsai, V., Crimi, C., Demars, R., Wentworth, P. A., Chesnut, R. W., Grey, H. M., Sette, A., Serra, H. M.** Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:2105-2109, 1994.
13. **Bigner, D. D., Brown, M. T., Friedman, A. H., Coleman, R. E., Akabani, G., Friedman, H. S., Thorstad, W. L., Mclendon, R. E., Bigner, S. H., Zhao, X. G.** Iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: phase I trial results. *Journal Clinical Oncology*, 16:2202-2212, 1998.
14. **Riva, P., Franceschi, G., Frattarelli, M., Riva, N., Guiduci, G., Cremonini, A. M., Giulaiani, G., Casi, M., Gentile, R., Jekunen, A., Kairemo, K. J.** 131I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant gliomaphase I and II study. *Acta Oncol*, 38:351-359, 1999.

15. **Heiner, J., Miraldi, F. D., Kallick, S., Makley, J., Smith-Mensah, W. H., Neely, J., Cheung, N. K. V.** *In vivo* targeting of GD2 specific monoclonal antibody in human osteogenic sarcoma xenografts. *Cancer Res.*, 47:5377-5381, 1987.

16. **Spendlove, I., James, L. L., Carmichael, J., Durrant, L. G.** Decay accelerating factor (CD55): a target for cancer vaccines? *Cancer Res.*, 59:2282-2286, 1999.

17. **Bruland, O., Fodstad, O., Funderud, S., Pihl, A.** New monoclonal antibodies specific for human sarcomas. *Int J Cancer*, 15:27-31, 1986.

18. **Weidner, N., Tjoe, J.** Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13 that recognizes glycoprotein 930/32MIC2 and is useful in diagnosing ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma. *American Journal of Surgical Pathology*, 18:486-494, 1994.

19. **Wang, N. P., Marx, J., McNutt, M. A., Rutledge, J. C., Gown, A. M.** Expression of myogenic regulatory proteins(myogenin and MyoD1) in small blue round cell tumors of childhood. *Am. J. Pathol.*, 147:1799-1810, 1995.

20. **Hatzubai, A., Maloney, D. G., Levy, R.** The use of a monoclonal anti-idiotypic antibody to study the biology of human B-cell lymphoma. *J. Immunol.*, 126:2397-2402, 1981.

21. **Cheung, N. K., Saarinen, U., Neely, J., Landmeier, B., Donovan, D., Coccia, P.** Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, 45:2642-2649, 1985.

22. **Kramer, K., Gerald, W., LeSauter, L., Saragovi, H. U., Cheung, N. K. V.** Prognostic value of TrkA protein detection my monoclonal antibody 5C3 in Neuroblastoma. *Clin. Can. Res.*, 2:1361-1367, 1996.

23. **Hecht, T. T., Longo, D. L., Cossman, J., Bolen, J. B., Hsu, S.-M., Israel, M., Fisher, R. I.** Production and characterization of a monoclonal antibody that binds reed-stenberg cells. *J. Immunol.*, 134:4231-4236, 1985.

24. **Seeger, R. C., Danon, Y. L., Rayner, S. A., Hoover, F.** Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. *J. Immunol.*, 128:983-989, 1982.

25. **Kaaijk, P., Troost, D., Morsink, F., Keehnen, R. M., Leenstra, S., Bosch, D. A., Pals, S. T.** Expression of CD44 splice variants in human primary brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 26:185-190, 1995.

26. **Wikstrand, C. J., Longee, D. C., McLendon, R. E., Fuller, G. N., Friedman, H. S., Fredman, P., Svennerholm, L., Bigner, D. D.** Lactotetraose series ganglioside 3',6'-isoLD1 in tumors of central nervous and other systems *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, 53:120-126, 1993.

27. **Pappo, A., Shapiro, D. N., Crist, W. M.** Rhabdomyosarcoma: biology and treatment. *Pediatr. Clin. North Am.*, 44:953-972, 1997.

28. **Fujisawa, T., Xu, Z. J., Reynolds, C. P., Schultz, G., Bosslet, I. V., Seeger, R. C.** A monoclonal antibody with selective immunoreactivity for neuroblastoma and rhabdomyosarcoma. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 30:345, 1989.

29. **Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J.** y col. Monoclonal Antibodies against EGFRvIII are Tumor Specific and React with Breast and Lung Carcinomas and Malignant Gliomas. *Cancer Res.*, 55:3140-48, 1995.

30. **Kishima, H., Shimizu, K., Tamura, K., Miyao, Y., Mabuchi, E., Tominage, E., Matsuzaki, J., Hayakawa, T.** Monoclonal antibody ONS-21 recognizes integrin $\alpha 3$ in gliomas and gliomas and medulloblastomas. *Br. J. Cancer*, 79:333-339, 1998.

31. **Moriuchi, S., Shimuzu, K., Miyao, Y., Hayakawa, T.** Characterization of a new mouse monoclonal antibody (ONS-M21) reactive with both medulloblastomas and gliomas. *Br. J. Cancer*, 68:831-837, 1993.

32. **Kondo, S., Miyatake, S., Iwasaki, K., Oda, Y., Kikuchi, H., Zu, Y., Shomoto, M., Namba, Y.** Human glioma-specific antigens detected by monoclonal antibodies. *Neurosurgery*, 30:506-511, 1992.

33. **Dastidar, S. G., Sharma, S. K.** Monoclonal antibody against human glioblastoma multiforme (U-87Mg) immunoprecipitates a protein of monoclonal mass 38KDa and inhibits tumor growth in nude mice. *J Neuroimmuno*, 56:91-98, 1995.

34. **Mihara, Y., Matsukado, Y., Goto, S., Ushio, Y., Tokumitsu, S., Takahashi, K.** Monoclonal antibody against ependymoma-derived cell line. *Journal of Neuro-Oncology*, 12:1-11, 1992.

35. **Daghighian, F., Pentlow, K. S., Larson, S. M., Graham, M. C., DiResta, G. R., Yeh, S. D., Macapinlac, H., Finn, R. D., Arbit, E., Cheung, N. K.** Development of a method to measure kinetics of radiolabeled monoclonal antibody in human tumour with applications to microdosimetry: positron emission tomography studies of iodine-124 labeled 3F8 monoclonal antibody in glioma. *Eur J Nucl Med*, 20:402-409, 1993.
- 5 36. **Plate, K. H., Breier, G., Farell, C. L., Risau, W.** Platelet derived growth factor b is induced during tumor development and upregulated during tumor progressin in endothelial cells in human gliomas. *Lab. Invest.*, 67:529-534, 1992.
- 10 37. **Yang, H. S., Lieska, N., Glick, R., Shao, D., Pappas, G. D.** Expression of 300-kilodalton intermediate filament-associated protein distinguishes human glioma cells from normal astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:8534-8537, 1993.
- 15 38. **Bigner, D. D., Brown, M., Coleman, E., Friedman, H. A., McClendon, R. E., Bigner, S. H., Zhao, X. G., Wikstrand, C. J., Pegram, C. N.** Phase I studies of treatment of malignant gliomas and neoplastic meningitis with ¹³¹I radiolabeled monoclonal antibodies anti-tenascin 81C6 and anti-chondroitin proteoglycan sulfate Mel-14 (ab')₂ - a preliminary report. *J Neuro Oncol*, 24:109-122, 1995.
- 20 39. **Mariani, G., Lasku, A., Pau, A., Villa, G., Motta, C., Calcagno, G., Taddei, G. Z., Castellani, P., Syrigos, K., Dorcaratto, A. y col.** A pilot pharmacokinetic and immunoscintigraphic study with the technetium-99m-labeled monoclonal antibody BC-1 directed against oncofetal fibronectin in patients with brain tumors. *Cancer Supplement*, 80:2484-2489, 1997.

25 Segunda serie de experimentos

Ensayos clínicos recientes han mostrado prometedoras posibilidades de anticuerpos monoclonales (MoAb) en el tratamiento de cáncer: dirigidos contra CD20 (linfoma), dirigidos contra HER2 (cáncer de mama), dirigidos contra tenascina (tumores cerebrales), dirigidos contra CD33 (leucemia) y dirigidos contra TAG-72 (cáncer de colon). En oncología pediátrica, los agentes que eligen como diana tumores son incluso más relevantes ya que la enfermedad residual mínima (ERM) es frecuentemente el obstáculo para la cura, y los efectos tardíos de la terapia no específica son significativos. A pesar de la terapia de combinación de alta intensidad, la mayoría de los tumores sólidos metastásicos (sarcoma de Ewing [ES], tumor neuroectodérmico primitivo [PNET], osteosarcoma [OS], tumor desmoplásico de células redondas pequeñas [DSRT], rabdomiosarcoma [RMS] y tumores cerebrales) siguen siendo incurables. Usando neuroblastoma metastásico (NB) para probar el principio, el laboratorio de los inventores integró el MoAb dirigido contra el gangliósido GD₂ de IgG3 murina 3F8 en terapia multimodal. 3F8 ha demostrado alta selectividad y sensibilidad en radioinmunodetección de tumores metastásicos, y parece ser un procedimiento seguro y eficaz de eliminar ERM, logrando >50% de supervivencia libre de progresión (SLP). No existen MoAb terapéuticos para la mayoría de los tumores sólidos pediátricos. Los antígenos tumorales de superficie conocidos se limitan frecuentemente a un tipo de tumor específico, heterogéneo en su expresión, o se encuentran en células sanguíneas normales u órganos. Los inventores describieron recientemente el MoAb 8H9 que reconoce un novedoso antígeno de superficie celular en un amplio espectro de tumores pediátricos, sin reactividad cruzada con sangre, médula, cerebro y órganos normales, y reactividad mínima con citoplasma de hepatocito. El 8H9 marcado con ¹³¹I o ^{99m}Tc puede obtener eficazmente imágenes de xenoinjertos de NB y RMS en ratones SCID. La expresión de antígenos fue generalmente homogénea dentro de tumores y no moduló la unión de MoAb. Los inventores proponen probar la posibilidad de elegir como diana ¹³¹I-8H9 en un estudio de obtención de imágenes piloto. Los pacientes pediátricos/adolescentes con NB, RMS, ES, PNET, OS, DSRT y tumores cerebrales son objeto de la investigación de los inventores. Los inventores tienen dos objetivos específicos:

50 Nº 1: Medir el nivel de concordancia entre la modalidad de obtención de imágenes convencional (CT, MRI y escaneos nucleares) y la obtención de imágenes del anticuerpo 8H9 en sitios conocidos y ocultos de enfermedad. Se realizará el análisis de sensibilidad de 8H9 para cada tipo de enfermedad.

55 Nº 2: Calcular la dosis absorbida administrada por ¹³¹I-8H9 al tumor con respecto a órganos normales.

Antecedentes y significancia

MoAb selectivos para tumores tienen potencial terapéutico^{1,2}. La introducción de tecnología de hibridomas por Kohler y Milstein en 1975³ y los avances en las técnicas biológicas moleculares han expandido enormemente el potencial de MoAb en cánceres humanos. La elección como diana óptima de MoAb requiere alta densidad de antígenos tumorales con expresión homogénea, falta de modulación de antígenos en la superficie celular tumoral, vascularidad adecuada del tumor para permitir una penetración profunda, mínima toxicidad en tejidos normales, baja captación del sistema reticuloendotelial (RES), ausencia de interferencia por antígenos libres en la circulación y baja inmunogenia. En la práctica, muy pocos sistemas de modelos de MoAb-antígeno-tumor han satisfecho estos rigurosos criterios. Ensayos clínicos recientes han mostrado prometedoras posibilidades de MoAb. El anticuerpo dirigido contra CEA en cáncer colorrectal⁴, anticuerpos dirigidos contra CD20 en linfoma⁵, anticuerpos dirigidos contra HER2 en cáncer de mama⁶, anticuerpos dirigidos contra tenascina en tumores cerebrales de la glía⁷, MoAb M195 contra CD33 en leuce-

mia aguda⁸ y anticuerpos dirigidos contra TAG-72 en cáncer de colon⁹ han demostrado eficacia en ensayos clínicos. El laboratorio de los inventores ha desarrollado el MoAb 3F8 que elige como diana el gangliósido G_{D2} expresado en exceso en NB. Se ha mostrado que 3F8 tiene una alta especificidad y sensibilidad en la radioinmunodetección de enfermedad residual mínima (ERM) en pacientes con NB¹⁰ y un impacto significativo cuando se usa como terapia adyuvante¹¹. El ¹³¹I ha sido un isótopo común usado tanto para fines de obtención de imágenes como de terapia. Aunque no están ampliamente disponibles, emisores puros tales como ⁹⁰Y^{12,13}, partículas emisoras alfa^{14,15} tales como ²¹¹At, ²¹²Bi y ²¹³Ac tienen propiedades atractivas con efectividad biológica prometedora. Pueden necesitarse múltiples radioisótopos de longitudes de trayectoria variables y pueden necesitarse semividas para potenciar la radiocurabilidad de tanto enfermedades malignas como microscópicas. Desarrollos más recientes en inmunocitocinas (por ejemplo IL-2, IL-12)¹⁶, anticuerpos biespecíficos para estrategias que eligen previamente diana (por ejemplo, radioisótopos o fármacos)^{17,18} o cuerpos T para volver a elegir como dianas células inmunitarias¹⁹⁻²¹ han expandido adicionalmente las posibilidades de las inmunoterapias basadas en anticuerpos.

Antígenos de tumores cerebrales. Ejemplos de antígenos tumorales expresados en tumores de la glía incluyen antígenos neuroectodérmicos-oncofetales, por ejemplo, moléculas de adhesión de células neurales (NCAM)²², gangliósidos (GD2, GM2, 3'-6"-iso LD1)^{23,24} y antígenos neurohematopoyéticos (Thy-1, CD44 y variantes de corte y empalme)²⁵⁻²⁷. Todos estos antígenos están presentes a grados variables en tejidos adultos y fetales normales, y también para algunos tejidos hematopoyéticos. A pesar de la expresión universal de NCAM por células neuronales, se mostró que el MoAb dirigido contra NCAM UJ13A se acumulaba localmente en gliomas en virtud de la alteración de la barrera hematoencefálica²⁸ y otro MoAb ERIC-1 mostró beneficio clínico en cavidades de glioma resecionadas.²⁹ La integrina 3, una proteína de 140 kDa expresada en gliomas y meduloblastomas y no en cerebro normal, es una posible diana (MoAb ONS-M21)³⁰, pero se expresa escasamente entre otros tipos de tumor³¹. La proteína de la matriz extracelular tenascina se expresa en el 50-95% de los gliomas, además de en tumores mesenquimatosos, carcinomas, células de la glía, de hígado y de riñón humanas normales³². Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra tenascina 81C6⁷, BC-2 y BC-4³³ administrados directamente en cavidades tumorales han mostrado eficacia en pacientes con gliomas malignos. Investigaciones más recientes se han basado en receptores de factores de crecimiento, en particular el receptor del factor de crecimiento epidérmico mutante de tipo III (EGFRvIII) expresado en el 52% de los gliomas³⁴, además de en carcinomas de mama y de pulmón³⁵. Dada la relación de estos receptores mutados con su potencial maligno, pueden ser dianas ideales para MoAb. Aunque se han descrito otros anticuerpos específicos de glioma sin reactividad cruzada con cerebro normal (por ejemplo 6DS1, MabEp-C4)³⁶⁻³⁸, tienen reactividad limitada con otros tumores neuroectodérmicos o mesenquimatosos y no están disponibles datos referentes a la reactividad cruzada con tejidos normales. Hasta la fecha, con la excepción de EGFRvIII, los antígenos de tumores de la glía descritos se encuentran o en el cerebro normal y/o en tejidos normales, limitados a tipos de tumor específico, o se encuentran en compartimentos intracelulares/matriz extracelular que pueden limitar su utilidad clínica para elegir como diana células o esferoides individuales.

Antígenos de sarcoma. Similarmente, los antígenos tumorales óptimos no se han definido para la gran familia de sarcomas. Aunque la familia MyoD de proteínas oncofetales es específica de rhabdomyosarcoma, están localizadas en el núcleo y, por tanto, no ofrecen dianas para terapia basada en anticuerpos³⁹. La familia ES de tumores puede diferenciarse de otros tumores de células redondas azules pequeñas de la infancia por MoAb que reconocen la glicoproteína p30/32 codificada por el oncogén MIC2. Sin embargo, esta proteína se expresa en tejidos normales (por ejemplo, linfocitos T)⁴⁰, limitando enormemente la utilidad del MoAb en el purgado de médula, obtención de imágenes por rayos X o radioterapia⁴¹. Las dianas de membrana en OS incluyen GD2⁴², glicoproteína p72⁴³, CD55⁴⁴, erbB2/neu⁴⁵ y el antígeno reconocido por el MoAb TP-3⁴⁶. CD55 es un factor acelerador de la degradación, una proteína ubicua en glóbulos sanguíneos y en la mayoría de los tejidos para evitar la activación del complemento. Claramente, el MoAb dirigido contra CD55 tendría limitaciones significativas para la elección como diana *in vivo*. El grado de heterogeneidad tumoral (por ejemplo, erbB2 en OS) también puede limitar la eficacia de la solución que elige como diana MoAb. La presencia de GD2 en fibras de dolor produce efectos secundarios de dolor significativos en ensayos clínicos. Sin embargo, este efecto secundario es de remisión espontánea y esta reactividad cruzada no interfirió con la biodistribución y la eficacia clínica de MoAb específico (véanse los resultados preliminares). Sin embargo, GD2 es generalmente bajo o está ausente en RMS, ES, PNET y muchos sarcomas de tejido blando. Además, la presencia de GD2 en neuronas centrales puede limitar su aplicación en tumores que se producen o que son metastásicos para el cerebro. El laboratorio de los inventores ha generado un MoAb 8H9 novedoso hiperinmunizando ratones BALB/c hembra con NB humano⁴⁷. 8H9 reconoce un único antígeno de superficie homogéneamente expresado en membranas celulares de un amplio espectro de tumores de origen neuroectodérmico, mesenquimatoso y epitelial, con distribución limitada en tejidos normales (véanse los resultados preliminares)⁴⁸.

La disponibilidad de un anticuerpo con amplia especificidad para tumores pediátricos facilitará varias líneas de investigaciones clínicas. *In vitro*, tales anticuerpos serán extremadamente útiles para (1) detectar metástasis de ganglios linfáticos o de médula⁴⁹, (2) enriquecimiento/aislamiento de células tumorales en circulación para las estrategias de detección por RT-PCR⁵⁰, (3) purgar médula ósea antes del trasplante autólogo de médula ósea⁵¹, (4) purgar *ex vivo* linfocitos T activados antes de terapia con células adoptivas. *In vivo*, su utilidad puede ir más allá de su capacidad diagnóstica. Si se quimeriza con una cola de IFC humano, se vuelve tumoricida mediante citotoxicidades mediadas por complemento y mediadas por células dependientes de anticuerpos⁵². Mediante construcciones de Fv monocatenarios, las nuevas proteínas de fusión pueden administrarse ahora a sitios tumorales (por ejemplo, IL-2, IL-12, toxinas o enzimas). Los scFv bivalentes y los scFv tetraivalentes pueden manipularse para mejorar la afinidad⁵³. Los scFv biespecíficos pueden construirse para ensamblar células y proteínas en diversas estrategias de elección de diana (por ejemplo, previa elección de diana)^{17,18}. scFv también puede usarse en cuerpos T para volver a elegir como diana linfocitos T,

una poderosa técnica para aumentar la frecuencia clónica, y evitar el requisito de HLA de funciones de TCR¹⁹⁻²¹. Además, las proteínas de fusión de scFv (por ejemplo, CD28, cadena zeta) transducidas en linfocitos T pueden potenciar enormemente su supervivencia tras la activación²¹. Aún más importante, la capacidad de tales células para proliferar en contacto con células tumorales puede amplificar adicionalmente la eficiencia de citoterapia con linfocitos T.

La radioinmunoescintigrafía puede probar si un sistema anticuerpo-antígeno tiene posibilidad de elegir diana.

Usando yodos radiactivos y tecnecio los inventores han demostrado la utilidad del sistema GD2 para la elección de diana en la última década. Esta información se ha trasladado a las estrategias de tratamiento usando tanto anticuerpo 3F8 sin marcar como marcado con ¹³¹I. Los cálculos de dosimetría han permitido cálculos estimados cuantitativos del índice terapéutico cuando los agentes citotóxicos se administran mediante procedimientos basados en anticuerpos. Puede medirse la captación (dosis pico y área bajo la curva ABC) en órganos específicos con respecto al tumor. Estos estudios requieren muchos recursos y para hacerse bien requieren apoyo de recursos de laboratorio, radioquímica, medicina nuclear, física médica y clínicos, además de un sustancial esfuerzo personal. En pacientes pediátricos, los problemas del índice terapéutico pueden ser incluso más urgentes dada la posibilidad de efectos tardíos del tratamiento. Además, a pesar de los posibles años de vida si no hubiera sido por el cáncer pediátrico, los fármacos sin interés comercial no son económicamente atractivos para la mayoría de los patrocinadores industriales. Estas circunstancias han hecho que las fases iniciales del desarrollo clínico sean incluso más estrictas y relativamente más difíciles de realizar.

Monitorización de pacientes y estudios de laboratorio correlativos. Los estudios farmacocinéticos son decisivos en

la comprensión de los inventores de la elección de anticuerpos como diana, su toxicidad y su eficacia. La radioinmunoescintigrafía usa el principio de marcas traza y gammagrafía para definir la distribución de un anticuerpo específico en diversos órganos humanos. Proporciona cálculos estimados de dosis de anticuerpo (y radiación) administradas a la sangre, médula y órganos principales. El desarrollo continuo de software y hardware mejorados para calcular depósitos de anticuerpos en tejidos es crítico en la implementación de estos estudios (véanse los resultados preliminares). Necesita definirse la relación cuantitativa de antígenos en circulación libres (si están presentes) y la biodistribución de MoAb. La formación de respuesta de anticuerpo humano dirigido contra IgG de ratón (HAMA) afectará claramente las propiedades *in vivo* de estos anticuerpos. Sin embargo, la inducción de la red de idiotipo (véanse los resultados preliminares) puede tener un posible beneficio en la realización prolongada. Estos parámetros necesitan monitorizarse. Estos ensayos *in vitro* proporcionarán información importante sobre la comprensión y la optimización del futuro uso de 8H9 y otro MoAb en el contexto de quimio-radioterapia para una amplia categoría de tumores resistentes al tratamiento en niños, adolescentes y jóvenes adultos.

El Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) se dedica a la investigación y el cuidado clínico de pacientes con cáncer. El centro tiene una amplia base de casos de pacientes, particularmente dentro del área triestatal. El centro tiene un compromiso firme e historial en el uso de anticuerpos monoclonales en el diagnóstico y la terapia de cánceres humanos que incluyen melanoma, cáncer de colon y leucemias. Durante los últimos 4 años, los inventores tienen una acumulación de aproximadamente 45 nuevos NB, 27 OS, 58 tumores cerebrales, 23 Ewing/PNET, 18 retinoblastomas, 12 rhabdomyosarcomas, 16 sarcomas y 7 DSRT en MSKCC. Los inventores tienen la plena confianza de que podrán acumular 60 pacientes dentro de los 2 próximos años. En esta última década, los inventores probaron la utilidad de MoAb en el tratamiento curativo de un tumor letal (NB de fase 4 metastásico en niños). Para esta enfermedad huérfana, la falta de patrocinadores empresariales/farmacéuticos ha hecho que el progreso de los inventores sea lento y difícil. Sin embargo, los inventores hicieron las siguientes observaciones. (1) El MoAb puede prolongar el periodo libre de progresión en un cáncer que era uniformemente letal hace dos décadas. (2) Es factible integrar MoAb en estrategias de quimio-radioterapia convencionales con el fin de derivar el máximo beneficio de todas las modalidades disponibles. (3) Las inmunoterapias pueden administrarse con seguridad en el ámbito ambulatorio, reduciéndose así los altos costes de pacientes ingresados y maximizando el tiempo en el ámbito domiciliario. (4) El MoAb puede inducir red de idiotipo, un posible criterio de valoración que subyace la biología en el mantenimiento de la remisión clínica continua. (5) El GD2 es un marcador útil de ERM, y los MoAb específicos son sumamente eficaces en la monitorización y la purga de células tumorales. (6) Se han desarrollado novedosas estrategias de bioingeniería para el sistema antígeno-anticuerpo GD2-3F8 que pueden aplicarse directamente a otros MoAb (Fv monocatenario⁵⁴ y cuerpos T⁵⁵). Durante este periodo, >240 pacientes han sido tratados en el Memorial Hospital con el anticuerpo 3F8. Se han administrado un total de >3500 dosis de 3F8 sin marcar, 250 inyecciones de ¹³¹I-3F8 para la obtención de imágenes y 372 inyecciones de ¹³¹I-3F8 para terapia. Aunque había efectos secundarios, no hubo secuelas letales durante o inmediatamente después de la administración de anticuerpo. El tratamiento con 3F8 se hace ahora rutinariamente en la consulta externa. La extensión de estos hallazgos a un segundo sistema antígeno-anticuerpo, especialmente a uno que elegirá como diana un espectro más amplio de tumores sólidos pediátricos, es una prioridad. El anticuerpo IgG1 murino 8H9 tiene un potencial obvio en la monitorización y purga de ERM, radioinmunoescintigrafía y radioinmunoterapia (tanto intravenosa como compartimental). Si el estudio propuesto de los inventores produce resultados favorables, es decir, captación tumoral selectiva a relaciones de ABC óptimas (tumor:tejidos/órganos), la radioinmunoterapia puede explorarse para algunos de estos tumores sólidos. Y, lo que es más importante, otro desarrollo del anticuerpo implicaría un mayor esfuerzo en la humanización y otra ingeniería genética para mejorar funciones efectoras.

Resultados preliminares

Terapia que elige como diana MoAb específico para G_{D2}: una solución curativa para un tumor sólido pediátrico: NB metastásico. La mejora de la comprensión de la biología de NB ha reestructurado la solución clínica de

los inventores para este cáncer. El NB de fase 4 no lactante sigue siendo un reto terapéutico a pesar de cuatro décadas de quimioterapia de combinación. Similar a muchos cánceres, el estado de ERM puede lograrse en pacientes con NB después de una intensa terapia de inducción^{56,57}. Desafortunadamente, la transición de ERM a cura era un tremendo obstáculo⁵⁶. La inmunoterapia que elige diana, además de ser más específica y menos tóxica, puede complementar lo que la quimioradioterapia no ha logrado^{58,59}. El disialogangliósido G_{D2} es un antígeno tumoral muy apto para terapia que elige diana debido a que (1) se expresa a una alta densidad en NB humano, está limitado a tejidos neuroectodérmicos y es genéticamente estable, a diferencia de otros antígenos tumorales tales como idiotipos de inmunoglobulina⁶⁰; (2) aunque circula en el suero de pacientes, no interfiere con la biodistribución del anticuerpo específico (por ejemplo, 3F8), permitiendo una excelente localización de tumores de NB en pacientes¹⁰; (3) no se modula desde la superficie celular tras la unión a anticuerpos; (4) se expresa homogéneamente en NB humano, con poca heterogeneidad dentro de tumores y entre pacientes. Se han descrito varios anticuerpos contra el antígeno de G_{D2} (3F8, 14.G2a, 14.18)^{47,61}. *In vitro*, pueden elegir como diana linfocitos^{62,63}, granulocitos^{52,64,65}, complemento^{66,67}, monocitos/macrófagos activados^{68,69}, IL2⁷⁰, isótopos^{10,59,71,72}, toxinas^{73,74} y superantígeno.⁷⁵ Los estudios de fase I y de fase II sólo han mostrado una modesta eficacia⁷⁶⁻⁸⁴, es más probable que responda la enfermedad medular que los tumores voluminosos⁸⁵. Los efectos secundarios principales incluyeron dolor, reacciones alérgicas y neuropatía^{78,85}. Con seguimiento prolongado, la función de estos anticuerpos dirigidos contra G_{D2} en el momento de ERM parece prometedora.

Anticuerpo dirigido contra G_{D2} 3F8 radiomarcado. 3F8 es un MoAb IgG₃ murino dirigido contra el gangliósido G_{D2} expresado en células de NB humano. En estudios preclínicos, ¹³¹I-3F8 eligió como diana xenoinjertos de NB humano con % de DI/g excepcionalmente alto. El MoAb IgG₃ marcado con ¹³¹I intravenoso 3F8 produjo una dosis sustancial dependiente del encogimiento de NB establecido en estudios preclínicos. Los cálculos de dosis sugirieron que los tumores que recibieron más de 4.200 rad fueron completamente eliminados. La supresión medular fue la toxicidad limitante de la dosis. En estudios en pacientes, no está atrapado no específicamente por el sistema reticuloendotelial y penetra en los NB bien (0,04 al 0,11% de dosis inyectada/g)^{10,86}. Debido a la barrera hemoencefálica intacta, el ¹³¹I-3F8 no se localiza normalmente en el cerebro, la médula espinal ni penetra en el LCR circundante^{10,59}.

El ¹³¹I-3F8 es más sensible que las modalidades convencionales que incluyen metayodobencilguanidina (MIBG) en la detección de NB en pacientes. La biodistribución de ¹³¹I-3F8 se estudió en 42 pacientes (2 mCi por paciente) con NB¹⁰. La comparación se hizo con gammagrafía ósea con ¹³¹I-MIBG, ^{99m}Tc-MDP (difosfonato de metileno marcado con tecnecio), además de CT o MRI. El ¹³¹I-3F8 detectó más sitios anómalos (283) que ¹³¹I-MIBG (138) o ^{99m}Tc-MDP (69), especialmente en pacientes con enfermedad extensa. En 20 pacientes con tumores de tejidos blandos demostrados por CT/MRI, el ¹³¹I-3F8 detectó la enfermedad en 18 de ellos. Tras la resección quirúrgica, los dos tumores negativos para la obtención de imágenes por ¹³¹I-3F8 revelaron ganglioneuroma, mostrando uno focos microscópicos de NB. A diferencia, todos tumores positivos para la obtención de imágenes por ¹³¹I-3F8 se confirmaron como NB. En 26 pacientes con signos de enfermedad medular por escaneo de anticuerpos, 14/26 tuvieron confirmación por exámenes de aspiración medular de cresta ilíaca/biopsia. La concordancia entre la radiactividad de tejido medida y los cálculos estimados basados en escintigrafía plana validaron los cálculos de dosimetría inicial. La captación tumoral en pacientes con NB fue del 0,08%-0,1% de DI/g. La dosis de radiación calculada fue 36 rad/mCi administrada a NB y 3-5 rad/mCi a sangre.

Gliomas diferenciados con ¹³¹I-3F8 de tejidos cerebrales normales^{87,88}. En 12 pacientes con tumores cerebrales, la inmunoescintigrafía de 3F8 se comparó con la obtención de imágenes planas con ^{99m}Tc-glucoheptonato/DTPA, tomografía de emisión de fotón único con talio 201 (SPECT) y tomografía por emisión de positrones con ¹⁸F-DG (PET). 10/11 gliomas malignos y 1/1 melanoma metastásico mostraron localización de anticuerpos. No se detectó captación no específica en cerebro normal o LCR. La eliminación promedio del plasma y del cuerpo total fueron 20 h y 47 h, respectivamente. La localización de anticuerpos se midió en especímenes quirúrgicos y las curvas de actividad del tiempo se calcularon basándose en vistas conjugadas modificadas o PET. La captación de radiactividad en glioma anaplásico alcanzó su punto máximo a 39 h, que entonces decayó con una semivida de 62 h. La captación tumoral en el momento de la cirugía obtuvo un promedio de 3,5% de DI/kg y la mayor actividad mediante el procedimiento de vista de conjugados obtuvo un promedio de 9,2% de DI/kg (3,5 a 17,8).

*Tanto el cáncer de pulmón de células pequeñas primario como metastásico se detectaron por ¹³¹I-3F8*⁸⁹. 10 pacientes con SCLC se sometieron a la obtención de imágenes con ¹³¹I-3F8. Cinco pacientes previamente tratados con quimioradioterapia se sometieron a la obtención de imágenes con 2 mCi en el momento de la recaída, mientras que 5 pacientes se estudiaron con 10 mCi/1,73 m² en el momento del diagnóstico. No se observaron toxicidades significativas. Los 10/10 tumores mostraron localización. La precisión de la localización se confirmó comparando SPECT y CT en los 5 pacientes inyectados con la dosis de 10 mCi. Las semividas promedio para la eliminación del plasma y del cuerpo total fueron 15 h y 58 h, respectivamente. Las relaciones de tumor con respecto a no tumor parecieron favorables basándose en el % de DI/g (véase más adelante).

Tabla 3: % de DI/kg después de inyección con ¹³¹I-3F8:

Tumor	Día muestreado	Corazón	Intestino delgado	Bazo	Hígado	Médula espinal	Intestino grueso	Sangre	Músculo	Riñón	Pulmón	Hueso	Ovario	Suprarrenal	Vejiga	Estómago	Tumor	hígado "mots"
NB	4	1,7	1,7	1,7	2	2,2	2,4	3,1	3,1	3,1	3,6	4	4	5,7	6,7	6,7	40	-
SCLC	6	0,4	0,4	0,9	0,4	-	-	-	-0,2	0,9	0,5	-	-	1,6	0,5	-	2	15

Dosis mieloablativas de ^{131}I -3F8 son eficaces para NB con toxicidades extramedulares mínimas. Basándose en la dosimetría de dosis de trazadores, la dosis absorbida por el hígado, bazo, médula roja, pulmón, cuerpo total y tumor fueron 537, 574, 445, 454, 499 y 4926 rad, respectivamente. Los rad/mCi promedio fueron 2,3, 2,5, 2, 2, 1,9 y 13,7, respectivamente. Las toxicidades químicas del anticuerpo 3F8 se han estudiado en estudios de fase I^{76,77} y fase II^{11,90}. Las toxicidades agudas incluyeron dolor, urticaria, fiebre e hipotensión que fueron de remisión espontánea. Las toxicidades radiológicas de ^{131}I -3F8 se definieron recientemente en un estudio de aumento de la dosis de fase I (6, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 mCi/kg)⁹¹. De entre 10 pacientes (pts) con enfermedad progresiva evaluable por respuesta, 2 purgaron la médula y 2 tuvieron respuestas parciales de tumores de tejido blando. La dosis tumoral promedio fue 150 rad/mCi/kg. Las toxicidades agudas de tratamiento con ^{131}I -3F8 incluyeron dolor (20/24) durante la infusión, fiebre (20/24) y diarrea leve. Todos los pts desarrollaron mielosupresión de grado 4. 22/24 pts fueron rescatados con médula ósea autóloga criopreservada; un paciente recibió GM-LCR; uno murió de enfermedad progresiva antes de la reinfusión de médula. Se desarrolló hipotiroidismo a pesar del bloqueo de la tiroidea con SSKI oral más Synthroid o Cytomel. En el posterior estudio de fase II (N7, IRB94-11, Figura 1) se usó ^{131}I -3F8 para consolidar >50 pacientes al final de la quimioterapia de inducción para su NB de fase 4 diagnosticada después de 1 año de edad. Excepto el hipotiroidismo, no hubo efectos posteriores del tratamiento con ^{131}I -3F8.

La obtención de imágenes por PET con ^{124}I -3F8 se aplicó satisfactoriamente por primera vez a NB⁹². La tomografía de emisión de positrones (PET) puede ofrecer ventajas con respecto a la obtención de imágenes por tomografía computarizada simple o de emisión de fotón único (SPECT) en la determinación cuantitativa de la distribución de la radiactividad espacial con el tiempo. ^{124}I es un emisor de positrones con una semivida de 4 días. Los inventores han estudiado la capacidad cuantitativa de la obtención de imágenes por PET con ^{124}I ⁹³ y lo han usado para escanear anticuerpos marcados con ^{124}I en animales y seres humanos^{92,94,95}. Usando un escáner de PET cerebral (PC4600, Cyclotron Corp.) con una resolución relativamente baja (FWHM = 1,2 cm), los inventores demostraron que la cuantificación de ^{124}I es posible (el intervalo examinado fue 0,4 a 4 uCi/ml). Los estudios usando ^{124}I en un tumor de rata (4 gramos) medido con este escáner de PET estuvieron dentro del 8% de la medición *ex vivo*. Posteriormente, dos pacientes se estudiaron en este escáner usando anticuerpo 3F8 marcado con ^{124}I ^{88,92}. Se usó un modelo de 3 compartimentos para estudiar la cinética del anticuerpo para proporcionar un cálculo estimado del potencial de unión del anticuerpo 3F8 por glioma. Estos estudios cuantitativos también han permitido a los inventores estimar la dosis de radiación para el núcleo de la célula tumoral de electrones Auger de baja energía⁸⁸. La determinación cuantitativa más precisa de ^{124}I es ahora posible con el escáner de PET corporal GE con incluso mayor resolución.

Terapia con ^{131}I -3F8 de cáncer leptomeníngeo⁹⁶. Aunque la enfermedad meníngea evidente es rápidamente mortal, los depósitos microscópicos en el eje craneoespinal se diseminarán, incluso si el tumor primario está erradicado. No se han explorado completamente las posibilidades de ligandos derivados de anticuerpos para el diagnóstico y la terapia de cáncer LM. El G_{D2} está presente en un amplio espectro de tumores humanos que incluyen meduloblastomas, astrocitomas anaplásicos, PNET, NB centrales, cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma, sarcomas, leucemia/linfomas y NB periféricos, muchos de los cuales tienen diseminación LM. Los ensayos clínicos usando inyecciones intravenosas de MoAb dirigido contra G_{D2} 3F8 no han encontrado neurotoxicidad a largo plazo en pacientes seguidos durante hasta 13 años. Los estudios farmacocinéticos en ratas mostraron que al menos el 50% del ^{131}I -3F8 intraventricular se eliminó por el flujo global. Si estaban presentes xenoinjertos de melanoma leptomeníngeo humano, la radiactividad LCR se conservó y el ABC (área bajo la curva) aumentó 1,5 veces. Las relaciones de ABC de tumor con respecto a LCR, tumor con respecto a cerebro y tumor con respecto a sangre fueron 14, 86, y 64, respectivamente. Estas relaciones mejoraron a 15, 209 y 97, respectivamente, cuando las ratas se pretrataron con diuréticos. La administración intraventricular directa de 30 mCi de ^{131}I -3F8 en monos cinomolgos no indujo toxicidad clínica ni histológica. Como la distribución en tejido de G_{D2} (SNC y periférico) en el mono cinomolgo es idéntica a la del ser humano, la alta dosis de radiación de IT ^{131}I -3F8 (hasta 82 Gy) al LCR a diferencia de a la sangre (<2 Gy) puede traducirse en una solución de tratamiento significativa. Además, el anticuerpo en suero contra el MoAb (AMA) fue 14-22 veces superior en el LCR, acelerándose así la eliminación de la sangre (reduciéndose la dosis de radiación en sangre) sin afectar la farmacocinética del LCR.

El ^{131}I -3F8 en intra-LCR obtuvo satisfactoriamente imágenes de cánceres LM positivos para G_{D2} en pacientes. El estudio piloto incluyó 5 pacientes que tenían un diagnóstico histológicamente confirmado de un tumor maligno que expresaba G_{D2} con enfermedad LM resistente a terapias convencionales o para el que no existía terapia convencional. Se evaluó la colocación del catéter de Ommaya, la permeabilidad y el flujo de LCR por estudios de DTPA con ^{111}In . Se evaluaron cinco pacientes (edades 1-61 años) con melanoma leptomeníngeo o intraventricular, ependimoma, tumor rabdoide (n=2) y retinoblastoma. La enfermedad activa se identificó por escaneos por MR en 4 de 5 pts, y por citología de LCR positiva en 2. Se inyectaron dosis de 0,7-1,9 mCi de ^{131}I -3F8 por el catéter de Ommaya. Los efectos secundarios agudos incluyeron fiebre (n=2) y cefalea (n=2), ambos tratados con tilenol, y un episodio de vómitos (n=1). Un pt tuvo una elevada presión de apertura del LCR que siguió elevada durante 36-48 horas después de la inyección. No hubo cambio apreciable en los leucocitos, número de trombocitos, pruebas de funciones hepática o renal o recuentos de células del LCR en los 5 pacientes.

La radiactividad del LCR, semivida biológica, distribución de la radiactividad en el eje craneoespinal y la dosimetría en placas de enfermedad y tejidos normales circundantes se determinaron por tomografía de emisión de fotón único con ^{131}I -3F8 (SPECT). Los valores del LCR pico se alcanzaron generalmente dentro de la primera hora de inyección. La semivida biológica del LCR fue 3-12,9 horas, y estaba de acuerdo con la SPECT (7,2-13,1 horas). La dosis estimada para el LCR fue 14,9-56 cGy/mCi por las muestras de LCR y 15-31 cGy/mCi por análisis de SPECT. Las áreas focales de captación tumoral fueron 27-123 cGy/mCi por cálculos estimados por SPECT. La dosis de radiación

a la sangre fue 0,9-1,9 cGy/mCi basándose en mediciones de radiactividad en sangre. Después de la inyección, los escaneos por SPECT con ^{131}I -3F8 mostraron la distribución por todo el espacio subaracnoideo a lo largo de la médula espinal hasta el nivel de la cola de caballo durante 4 horas, y progresivamente durante la convexidad durante 24 horas en todos los pacientes. La captación de ^{131}I -3F8 focal se demostró en los ventrículos, la columna vertebral y el mesen-
 5 céfalo en 4 pacientes, correspondientes a enfermedad vista en MR. En el único paciente que no tenía signos de MR de enfermedad, la eliminación de ^{131}I -3F8 fue la más rápida (3 horas), sin acumulación focal observada en SPECT. Cuatro pacientes con captación de ^{131}I -3F8 focal recibieron 10 mCi de ^{131}I -3F8 por el reservorio de Ommaya como parte de un protocolo de tratamiento en un estudio de toxicidad de fase I. Excepto las toxicidades de grado 2 (fiebre, cefalea, náusea y vómitos, aumento de la presión intracraneal) y una convulsión intercurrente, no hubo efectos secundarios
 10 adversos durante su tratamiento inicial. Un paciente tuvo una respuesta radiográfica y clínica. En el tratamiento de repetición 2 meses después con la misma dosis, un rápido aumento de la presión intracraneal necesitó una colocación de derivación. Aunque los 4 pacientes tratados progresaron, 3 están todavía vivos (2+, 3+ y 9+ meses de tratamiento).

Anticuerpo dirigido contra G_{D2} 3F8 con adyuvante. También se ha probado 3F8 (sin radioisótopo) en estudios de fase I y fase II^{58,76,77}. Se observaron respuestas de NB metastásico en la médula ósea. Otro anticuerpo de ratón 14.G2a y su forma quimérica 14.18 también han inducido remisiones medulares en pacientes con NB⁸³. Las toxicidades agudas de remisión espontánea del tratamiento con 3F8 fueron dolor, fiebre, urticaria, hipertensión, reacciones anafilactoides, además de disminuciones en los hemogramas y los niveles de complemento en suero, y en pacientes raros neuropatía de remisión espontánea^{71,97-99}.

*Tratamiento con anticuerpo dirigido contra G_{D2} de ERM en NB de fase 4 diagnosticado a más de un año de edad*¹¹. Se trataron treinta y cuatro pacientes (pts) con 3F8 al final de quimioterapia. La mayoría tenía tanto metástasis de médula ósea (31 pts) como óseas a distancia (29 pts). Trece pts se trataron en la segunda remisión o posterior (grupo I), y 12 pts en este grupo tenían una historia de enfermedad progresiva/persistente después de ABMT; 21 pts (todos en el protocolo de N6) se trataron en la primera remisión tras la quimioterapia de inducción (grupo II). En el momento del tratamiento con 3F8, los 34 pacientes tenían NB estable o mínimo. Veintitrés pacientes estaban en CR, 8 en VGPR, 1 PR y 2 con pruebas histológicas de enfermedad medular. Como el NB oculto microscópico pudo escapar de la detección por estudios radiográficos convencionales, se usaron tres procedimientos sensibles adicionales para documentar la enfermedad antes del tratamiento con 3F8. Fueron inmunoescintigrafía con ^{131}I -3F8, inmunocitología
 25 medular y detección molecular de médula GAGE por RT-PCR. Catorce de 34 pacientes fueron positivos por escaneo para ^{131}I -3F8 antes del tratamiento con 3F8. Nueve tenían enfermedad residual en su médula por inmunocitología y 12 tenían pruebas de enfermedad medular por RT-PCR. Un total de 25/34 pacientes dieron positivo para la enfermedad por al menos uno de estos tres procedimientos. Trece pacientes están libres de progresión (40 a 148+ meses desde el inicio del tratamiento con 3F8); otro paciente está vivo con enfermedad 61+ meses después del tratamiento con 3F8.
 30 Tanto los pacientes del grupo I como del grupo II alcanzaron una probabilidad libre de progresión a largo plazo del 38%. Entre los 20 pacientes cuya enfermedad progresó después de 3F8, 3 en el grupo II tuvieron una recaída aislada en el SNC, un sitio santuario en el que el anticuerpo 3F8 no podía penetrar⁸⁶. Aunque la mayoría de los pacientes estuvieron en CR/VGPR por criterios convencionales justo antes del tratamiento con 3F8, el 74% tenía signos de enfermedad por los procedimientos más sensibles (inmunoescintigrafía con ^{131}I -3F8, inmunocitología de médula ósea y RT-PCR). Cuando estas pruebas se repitieron después del tratamiento con 3F8, 6/9 pacientes con inmunocitología positiva invirtieron a indetectable. Entre los 12 pacientes positivos por GAGE, 7 fueron negativos para la expresión de GAGE. Seis pacientes tuvieron escaneos con ^{131}I -3F8 después del tratamiento con 3F8 y los 6 mostraron resolución o mejora.

Respuesta de anticuerpo humano dirigido contra IgG de ratón (HAMA) y resultado de pacientes: Se identificaron tres patrones de respuesta de HAMA. En el modelo I, HAMA no fue detectable durante el periodo de seguimiento de 4-6 meses después del primer ciclo de 3F8, el 42% no tuvo respuesta de HAMA incluso después de recibir 2-4 ciclos de 3F8 durante un periodo de 4-25 meses. En el modelo II, HAMA se detectó, pero rápidamente se volvió negativa durante el periodo de seguimiento de 4-6 meses. En el modelo III, el título de HAMA era alto (>5000 U/ml) y persistente durante el periodo de seguimiento de 4-6 meses. Cuando los pacientes desarrollaron HAMA (>1000 U/ml) durante un ciclo de tratamiento, desaparecieron los efectos secundarios del dolor. En ausencia de HAMA (modelo I) o cuando HAMA se volvió negativa (modelo II), los pacientes recibieron tratamiento de repetición con 3F8. En la presencia de HAMA, los tratamientos con 3F8 posteriores tuvieron que retrasarse. Por tanto, los pacientes en el grupo III no recibieron el tratamiento de repetición con 3F8 durante los primeros 4-6 meses, y tuvieron menos ciclos totales y
 55 menos días totales de tratamiento con 3F8, mientras que los pacientes del modelo I y II fueron comparables. El análisis de Kaplan Meier mostró una ventaja de supervivencia para aquellos con respuesta de HAMA del modelo II, es decir, una respuesta de HAMA de remisión espontánea baja (73% para el modelo II frente al 33% para el modelo I, y 18% para el modelo III). La probabilidad de supervivencia entre pacientes con modelo II fue significativamente mejor que los pacientes del modelo I y III combinados ($p < 0,05$). Para pacientes libres de progresión durante al menos 12 meses después del último ciclo de quimioterapia, aquellos que recibieron cuatro ciclos de 3F8 tuvieron una probabilidad de SLP del doble en comparación con aquellos que recibieron menos de 4 ciclos ($p = 0,08$). Cuando los pacientes con respuesta de HAMA del modelo II y/o cuatro ciclos de 3F8 se consideraron como un grupo (Figura 1), su supervivencia fue significativamente mejor que la de los otros 20 pts ($p < 0,001$). Los inventores interpretan que estos hallazgos significan que puede ser necesario un umbral (cuatro ciclos de 3F8, ciclos de 10 días cada uno) más una respuesta de
 60 HAMA del modelo II para mantener el control permanente de tumores.

La red de idiotipo es un mecanismo posible para SLP a largo plazo. Como la respuesta de HAMA fue principalmente antiidiotípica (Ab2), los inventores postularon que la posterior inducción de una red de idiotipo que incluía

respuestas anti-antiidiotípicas (Ab3) y dirigidas contra G_{D2} (Ab3') podía ser responsable del control de tumores en pacientes. Se midieron sus títulos de HAMA, Ab3 y Ab3' en suero antes de, a 6, y a 14 meses después del tratamiento con anticuerpo por ELISA. La SLP a largo plazo y la supervivencia guardaron una relación significativa con respuesta de Ab3' (dirigido contra G_{D2}) a 6 meses, y con respuesta de Ab3 a 6 y 14 meses. Las respuestas de anticuerpos no

5 idiotipo (IgG3 dirigida contra IgG de ratón o antígeno de HUD dirigido contra tumor nuclear) no tuvieron impacto aparente sobre la SLP o supervivencia. Parece que la inducción satisfactoria de una red de idiotipo en pacientes puede ser responsable del control de tumores a largo plazo y la prevención de recaídas posteriores entre pacientes de N6 y N7 (Figura 2). Incluso entre pacientes tratados en N5 (con ABMT, Figura 2), todos los supervivientes de metástasis óseas y medulares han tenido estudios de obtención de imágenes con 3F8 y tuvieron una red de idiotipo detectable

10 por ELISA¹⁰⁰; similarmente, no se observaron recaídas posteriores. Mientras que los grupos N5 y N6 no tuvieron recaídas después de ~ 3 años desde el diagnóstico o ~ 2 años desde la terapia con 3F8 (incluyendo el segundo grupo de remisión), entre pacientes de N7, la curva de recaída se ha nivelado incluso antes, aproximadamente 2 años desde el diagnóstico.

15 *Integración del tratamiento con 3F8 en terapia multimodal: N5, N6 y N7 para NB de fase 4 >1 año de edad:* De 1987 a 1999 se diseñaron secuencialmente los protocolos N5, N6 y N7 para probar la importancia clínica de la intensidad de dosis, 3F8 y ¹³¹I-3F8 en pacientes consecutivos con NB de fase 4 recientemente diagnosticado. La mayoría de ellos tenían marcadores clínicos y biológicos de alto riesgo, casi todos eran diploides/tetraploides y de histopatología desfavorable. Excepto ¹³¹I-3F8 y el trasplante autólogo de médula (ABMT), la quimioterapia y 3F8 son

20 procesos ambulatorios rutinarios. Se compararon favorablemente evaluaciones en criterios de valoración secuenciales con predicciones: resectabilidad de tumores primarios, respuesta global y supervivencia libre de progresión (SLP). No hubo recaídas posteriores después de 3,5 años desde el diagnóstico. Para N6 (todos los supervivientes pasaron los 5 años), el 40% están libres de progresión; para N7, la SLP está proyectada al 55% (p=0,02 cuando se comparó con N5). La causa de muerte incluyó progresión de enfermedad, leucemia secundaria y recaída del SNC aislada. Aunque

25 las toxicidades incluyeron sordera parcial e hipotiroidismo que requirió corrección, una estrategia curativa para NB de fase 4 pareció estar al alcance.

Neuroblastoma, 3F8 y GD2 proporcionó a los inventores la prueba del principio de que el MoAb puede tener posibilidades en la erradicación permanente de ERM en el tratamiento curativo de tumores sólidos en la población

30 más joven. Tanto RIT como la inducción de red de idiotipo son posibles con MoAb murino. Por tanto, los inventores realizaron un extenso cribado de MoAb para identificar candidatos con una amplia reactividad con tumores sólidos pediátricos/adolescentes que pueden tener la posibilidad de elección de diana similar a la del anticuerpo 3F8.

35 *Antígeno novedoso para la elección como diana de MoAb para tumores sólidos en niños y jóvenes adultos.* Se hiperinmunizaron ratones BALB/c hembra con neuroblastomas humanos según procedimientos previamente explicados resumidamente⁴⁷. Los linfocitos esplénicos se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón SP2/0. Los clones se seleccionaron para la unión específica a neuroblastoma en ELISA. El hibridoma de 8H9 que secretó un anticuerpo monoclonal IgG1 se seleccionó para la caracterización adicional después de la subclonación.

40 *Reactividad con tejido normal y tumoral del anticuerpo 8H9.* Se analizaron secciones congeladas de 315 tumores con diagnósticos histológicamente confirmados de cáncer para inmunoreactividad con MoAb 8H9 (Tablas 5 y 6). También se analizaron 15 tejidos humanos histológicamente normales y 8 tejidos de mono normales ().

45 **Tabla 5**

Tumores neuroectodérmicos	Nº	Positivo para 8H9	%
NB	87	84	97
Tumores cerebrales			
1. Tumores de la glía			
50 Glioblastomas multiformes	17	15	88
Glioma mixto	4	3	-
Oligodendroglioma	11	4	36
Astrocitoma	8	6	75
55 Ependimoma	3	2	-
2. PNET primitivo			
Meduloblastoma	2	2	-
3. Mixto			
Tumor neuroglial	2	1	-
60 4. Otros			
Schwannoma	3	3	-
Meningioma	2	2	-
Neurofibroma	1	1	
Melanoma	16	12	75
65 Familia de tumores de Ewing	21	21	100
TOTAL	177	156	88

Tabla 6			
Tumores mesenquimatosos	Nº	Reactivo con 8H9	%
Rabdomiosarcoma	26	25	96
Osteosarcoma	26	25	96
Tumor desmoplásico de células redondas pequeñas	34	32	94
Histiocitoma fibroso maligno	1	1	-
Sarcoma sinovial	2	1	-
Leiomiomasarcoma	4	4	-
Sarcoma sin diferenciar	2	2	-
TOTAL	95	90	95

Tabla 7			
CARCINOMAS	Nº	Reactivo con 8H9	%
Mama	12	4	33
Vejiga	4	1	-
Suprarrenal	2	1	-
Estómago	1	1	-
Próstata	2	1	-
Colon	2	1	-
Pulmón	1	1	-
Endometrio	1	1	-
Cuello del útero	1	0	-
Renal	1	1	-
TOTAL	27	12	44

Tabla 8			
Otros tumores	Nº	Reactivo con 8H9	%
Hepatoblastoma	4	3	-
Tumor de Wilm	8	7	-
Tumor rabdoide	3	3	-
Paraganglioma	1	1	-
TOTAL	16	14	88

La tinción citoplásmica no específica heterogénea se notó en páncreas, estómago, hígado y corteza suprarrenal humanos normales que disminuyó cuando se usaron fragmentos F(ab')₂ de 8H9 en lugar del anticuerpo completo para inmunotinción. Ninguno de los otros tejidos humanos mostró reactividad con 8H9. En particular, secciones de tejido de cerebro humano normal que incluyen lóbulo frontal, médula espinal, protuberancia y cerebelo fueron completamente negativas. Los tejidos normales de mono cinomolgo también demostraron reactividad similarmente limitada con tinción no específica observada en estómago e hígado (Tabla 4). La mayoría de los tumores neuroectodérmicos y mesenquimatosos probados mostraron reactividad positiva con 8H9, los tumores epiteliales a un menor grado. La inmunorreactividad con 8H9 se observó en una distribución de la membrana celular homogénea característica en 272 de las 315 (86%) muestras tumorales examinadas. El 88% de los tumores neuroectodérmicos, el 95% de los tumores mesenquimatosos y el 44% de los tumores epiteliales dieron positivo con 8H9 (Tablas 4-8).

Tabla 4		
Tejidos	Humano	Cinomolgo
Lóbulo frontal	Negativo	Negativo
Protuberancia	Negativo	Negativo
Médula espinal	Negativo	-
Cerebelo	Negativo	Negativo
Pulmón	Negativo	-
Corazón	Negativo	-
Músculo esquelético	Negativo	-
Tiroides	Negativo	-
Testículos	Negativo	-
Páncreas	Tinción citoplásmica	-

Tejidos	Humano	Cinomolgo
Corteza suprarrenal	Tinción citoplásmica	Tinción citoplásmica
Hígado	Tinción citoplásmica	Tinción citoplásmica
Estómago	-	Negativo
Colon sigmoide	Negativo	-
Médula ósea	Negativo	-
Riñón	Negativo	Negativo

Inmunofluorescencia indirecta. La inmunorreactividad con 8H9 en 34 líneas de células de NB, melanoma, RMS, cáncer de pulmón de células pequeñas, OS, glioblastoma, leucemia, cáncer de mama y cáncer de colon se probó usando inmunofluorescencia indirecta. Se detectó reactividad de la membrana celular de moderada a fuerte con 8H9 en 16/16 NB, 2/2 melanoma, 2/2 RMS, 1/1 glioblastoma multiforme, 3/3 cáncer de mama y 1/1 cáncer de colon, 2 de 3 Ewing/PNET y 2 de las 3 líneas celulares de OS. La línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas HTB119 dio negativa con 8H9, al igual que la línea celular T-ALL y las células linfoblastoides transformadas con EBV. Las células mononucleares de la médula ósea humanas normales ($n=80$) y los hepatocitos ($n=2$) no tuvieron reactividad con 8H9. Se aislaron hepatocitos de cadáveres humanos y se tiñeron con 8H9. A diferencia de los anticuerpos dirigidos contra citoqueratina 18 y dirigidos contra HLA de clase I que reaccionaron fuertemente con antígenos de superficie, la tinción con 8H9 fue equivalente al anticuerpo de control.

Modulación de antígenos. La unión de 8H9 a la línea de neuroblastoma (NMB7), rhabdomyosarcoma (HTB82) y OS (U2OS) (medida por inmunofluorescencia indirecta) no disminuyó significativamente después de 48 h de incubación a 37°C. Durante el mismo periodo, la unión a HLA (MoAb HB95) disminuyó el 85% y a GD2 (3F8) el 55%, respectivamente (Figura 3). La microscopía electrónica usando anticuerpos marcados con oro será más definitiva en la trazabilidad de la internalización de anticuerpos, un procedimiento claramente importante para que las inmunotoxinas sean eficaces.

Sensibilidad a enzimas. Hubo una reducción dependiente de la dosis de Pronase en la reactividad con 8H9 con el 75-85% de pérdida de inmunofluorescencia a una concentración de Pronase final de 0,3 mg/ml (Figura 4). No hubo pérdida apreciable de reactividad con 3F8 (específico para el gangliósido GD2) en células NMB7. Además, el antígeno de 8H9 no fue sensible a neuraminidasa o fosfolipasa C específica de fosfatidil-inositol (datos no mostrados).

Caracterización bioquímica del novedoso antígeno reconocido por 8H9. Usando una técnica de marcado de superficies celulares no radiactivas, el antígeno se inmunoprecipitó y se analizó en una SDS-PAGE¹⁰¹. En resumen, células de NB NMB7 o de OS U2OS se biotinilaron usando biotina-LC-NHS, se lisaron, se purificaron previamente con proteína G-Sepharose, se hicieron reaccionar con anticuerpo 8H9 y luego se inmunoprecipitaron en proteína G-Sepharose fresca. Entonces, el antígeno se disoció del gel y se separó por SDS-PAGE. Tras la transferencia sobre membrana de nitrocelulosa, las bandas de proteína se detectaron con HRP-estreptavidina y se visualizaron por ECL. Se encontró una banda de 90 kDa bajo condiciones no desnaturizantes y 96 kDa en presencia de 2ME.

Tabla 9:		% de DI/g				% de DI/g	
TEJIDO		NB	RMS	TEJIDO		NB	RMS
Tiempo		24 h	172 h	Tiempo		24 h	172 h
Tumor		8,3	5,3	Fémur		0,7	0,3
Cerebro		0,2	0,1	Suprarrenal		1,0	0,3
Corazón		2,1	0,8	Piel		0,2	0,4
Pulmón		0,8	1,4	Columna vertebral		1,7	0,4
Riñón		2,3	0,7	Sangre		3,8	3,3
Hígado		7,5	0,6				
Bazo		6,7	0,6				
Vejiga		1,0	1,1				
Estómago		0,3	0,5				
Intestino delgado		0,3	0,3				
Intestino grueso		0,4	0,2				
Músculo		0,2	0,2				

MoAb antiidiotípico de rata específico para 8H9. Por inmunofluorescencia, el antígeno era sensible a bajas temperaturas. En vista de la labilidad del antígeno, los inventores eligieron sintetizar anticuerpos antiidiotípicos como imitadores de antígenos sustitutos con el fin de permitir la monitorización *in vitro* de la inmunorreactividad del anticuerpo, por ejemplo, después de yodación del anticuerpo 8H9. Se inmunizaron ratas LOU/CN con 8H9 purificado con proteína G precipitado con anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de ratón emulsionado en CFA. Tras la hibridación *in vitro* con los mielomas SP2/0 ó 8653 se seleccionaron 3 clones de IgG2a (2E9, 1E12 y 1F11) por su alta unión y especificidad. Cuando se probaron contra un panel de otros 23 mielomas o anticuerpos de hibridoma no se encontró reactividad cruzada. Los hibridomas antiidiotípicos se clonaron y los anticuerpos se produjeron por el biorreactor

miniPERM de alta densidad de Unisyn Technologies (Hopkinton, MA). Los anticuerpos antiidiotípicos se purifican adicionalmente por cromatografía de afinidad en proteína G (Pharmacia). Para demostrar adicionalmente que estos anticuerpos antiidiotípicos son imitadores de antígeno, los inventores inmunoenriquecieron fagémidos y cribaron scFv en anticuerpo antiidiotípico de fase sólida, y aislaron satisfactoriamente varios scFv de 8H9 con especificidad de unión similar por tumores como el 8H9 parental (véase más adelante).

Localización de tumores en ratones SCID xenoinjertados. Se inyectaron iv ratones SCID con xenoinjertos de NB (NB) con 100 ug de 8H9 marcado con ^{99m}Tc . La eliminación de la sangre se estudió por cpm de sangre a diversos intervalos después de la inyección. Los ratones se sacrificaron a las 24 horas y la captación tisular se expresó como porcentaje de dosis inyectada por gramo (Tabla 9). La captación significativa en el sistema reticuloendotelial en el hígado y el bazo sólo se observó con ^{99m}Tc -8H9; ninguna fue evidente cuando se usó 1-3F8. No había diferencia significativa entre la biodistribución de ^{99m}Tc -8H9 y ^{131}I -8H9. Cuando la actividad específica de ^{131}I -8H9 aumentó de 5 a >20 mCi/mg no hubo degradación de la obtención de imágenes de tumores o diferencia en la biodistribución. En ratones SCID xenoinjertados con xenoinjerto de RMS (RMS), tras la inyección iv de 100 uCi de ^{125}I -8H9, la captación tumoral selectiva fue evidente a 4 a 172 h después de la inyección, con una $T_{1/2}$ en sangre de 0,8 h y $T_{1/2}$ de 26 h. Las relaciones medias de tumor/tejido fueron óptimas a 172 h (para pulmón 4, riñón 7, hígado 9, bazo 10, fémur 16, músculo 21, cerebro 45). La relación promedio de tumor/sangre fue 0,7, 1,4 y 1,6, y la captación tumoral fue $9,5 \pm 3,4$, $13,3 \pm 1,5$ y $5,3 \pm 0,9\%$ de dosis inyectada por g a 24, 48 y 172 h, respectivamente. El anticuerpo MoAb IgG1 de control 2C9 permaneció en la mezcla de sangres sin localización en xenoinjertos de RMS sc. La relación de tejido tumoral con respecto a normal fue favorable [intervalo 5-55] para 8H9 (barra rellena, Figura 5) a diferencia del MoAb de control 2C9.

scFv de 8H9. Los inventores han sintetizado anticuerpo monocatenario (scFv) de 8H9. Usando corte y empalme por reacción en cadena de la polimerasa mediante extensión por solapamiento, las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de 8H9 se unieron mediante un polilígador (L) (gly4Ser)₃ y se seleccionaron por expresión en fagémido. scFv se caracterizó por secuenciación de ADN, transferencias Western, ELISA *in vitro*, inmunotinción/FACS y análisis de idiotipo. Usando este scFv como unidad que elige diana, los inventores están en el proceso de sintetizar el scFv-h 1-CH2-CH3 quimérico, el scFv-m 3-CH2-CH3 quimérico y cuerpos T para volver a elegir como diana linfocitos T.

Poblaciones de células usando inmunoselección con perlas magnéticas para 8H9. ES un tumor de células azules redondas pequeñas de la infancia caracterizado por un t(11,22) en la mayoría de los pacientes. Debido a que la supervivencia sigue siendo inferior a la óptima con terapia convencional, muchos pacientes reciben trasplante autólogo de citoblastos y están en proceso ensayos actuales que investigan la transferencia adoptiva de linfocitos T autólogos en el contexto de la inmunoterapia. Sin embargo, aproximadamente el 50% de los pacientes con enfermedad avanzada tienen ES detectable por PCR en sangre periférica y/o médula ósea y la administración de preparaciones autólogas de células contaminadas con tumor puede contribuir a una recaída de la enfermedad. Hasta la fecha no se ha informado de ningún procedimiento para purgar poblaciones de células hematopoyéticas contaminadas o preparaciones de médula ósea de ES. Merino y col. en el laboratorio del Dr. Mackall en Pediatric Oncology Branch, NCI, Bethesda, MD, optimizaron satisfactoriamente 8H9 para el purgado inmunomagnético de ES. 8H9 se unió a 9/9 líneas celulares de ES por citometría de flujo. La unión a poblaciones de linfocitos T y linfocitos B mononucleares de la sangre periférica, además de a células CD34+ de médula ósea, fue negativa. Utilizando selección inmunomagnética, 8H9 se usó para aislar células de ES de poblaciones de células de sangre contaminada. Usando PCR anidada cuantitativa en tiempo real con el instrumento Lightcycler, la eficiencia del purgado se monitorizó por RT-PCR de t(11,22). Los especímenes contaminados se hicieron reaccionar con 8H9 y luego se incubaron con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo de rata dirigido contra IgG1 de ratón. Entonces, la muestra se vertió en una columna de selección negativa Miltenyi Variomax. La recuperación fue aproximadamente el 70% de las PBMC totales. Se extrajo ARN de 10^7 células de poblaciones de células antes y después de la purga. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con un nivel de sensibilidad por una célula tumoral en 10^5 células normales. Se logró una reducción de 2 logaritmos de células tumorales a una contaminación de una célula tumoral en 10 PBMC normales y una célula tumoral en 10^3 PBMC normales. Están en proceso otros estudios que evalúan la eficacia en muestras clínicas. Estos resultados demuestran una posible nueva solución para purgar muestras de pacientes contaminadas para usarse en el contexto de trasplante autólogo de médula ósea y/o ensayos de inmunoterapia para ES.

Purga con 8H9 de NB de médula o glóbulos sanguíneos. En experimentos similares usando perlas Dynal recubiertas con anticuerpo humano dirigido contra IgG de ratón (Dynal, Lake Success, NY)⁵⁰, células NMB7 marcadas con EGFP pudieron eliminarse cuantitativamente en estrategias inmunomagnéticas de un ciclo (tanto 8H9 como 3F8) como 2 ciclos (8H9 seguido de 3F8) (Tabla 10).

60 *Diseño de investigación y procedimientos*

Los inventores probarán si las inyecciones intravenosas de MoAb 8H9 murino marcado con yodo-131 pueden detectar tumores sólidos primarios y metastásicos. Se acumulará un total de 60 pacientes durante un periodo de 2 años.

Nº 1: Para definir el nivel de concordancia entre ^{131}I -8H9 y las modalidades de obtención de imágenes convencionales en la detección de tumores sólidos primarios y metastásicos en pediatría.

1.1 Diseño del estudio

Este es un estudio de un único brazo de etiqueta abierta de ^{131}I -8H9, inyectado intravenosamente a 10 mCi/1,73 m² de dosis, después de que pacientes se sometiera a obtención de imágenes a aproximadamente el día 0 a 1, 2 d, 3 d y siempre que fuera posible 6 a 7 d para cálculos de dosimetría. También se obtendrán muestras de sangre al menos 12 veces durante los 7 días siguientes. Los pacientes tienen derecho a elegir el protocolo antes de su resección quirúrgica o biopsia de tumor conocido o sospechado, o en el momento de tumor recurrente. La inyección de ^{131}I -8H9 más obtención de imágenes puede repetirse en cada paciente hasta un total de 3 veces, pero sólo si no tiene HAMA y no tiene alergia a proteínas de ratón como se demuestra por una prueba en la piel negativa.

1.2 Criterios de inclusión de pacientes/sujetos

Inclusión de sexo y minoría para la investigación que implica sujetos humanos

El Memorial Sloan-Kettering Cancer Center ha presentado el formulario HHS 441 (Asunto: Derechos civiles), formulario HHS 641 (Asunto: Individuos discapacitados) y el formulario 639-A (Asunto: Discriminación por sexo). En la selección de pacientes para el estudio en el proyecto propuesto se toma debida consideración de la Política de los NIH referente a la inclusión de mujeres y minorías en poblaciones de investigación clínica. La población en estudio será completamente representativa de todo el ámbito de pacientes vistos en el Memorial Hospital. No se harán exclusiones basándose en sexo u origen étnico. Sin embargo, debido a la naturaleza de estos cánceres que tienden a presentarse en niños y jóvenes adultos, la mayoría de los sujetos humanos será del grupo de la edad más joven.

Basándose en un análisis de diciembre de 1998-noviembre de 1999 de la población de pacientes acumulada para los protocolos clínicos terapéuticos, la distribución racial de estos pacientes fue 16,6% de negros, hispanos o asiáticos, 78,2% de blancos y 5,2% de otras o desconocido. El sexo fue 55,9% de hombres y 44,1% de mujeres. Para la población de pacientes totales diagnosticada y tratada en MSKCC en 1996, el 26% fueron negros, hispanos, asiáticos o americanos nativos, el 70% blancos y el 6% desconocido o no respondió. De estos pacientes, el 38% fueron hombres y el 62% mujeres.

Participación de niños: Niños, adolescentes y jóvenes adultos son los sujetos de este ensayo clínico debido a la naturaleza de estos cánceres. No hay edad límite.

1.3.0 Evaluación durante el tratamiento/intervención

1.3.1 Después de la inyección de anticuerpo radiomarcado se extraerán 1-2 cc de sangre en tubos de tapón violeta (EDTA) en el momento 0, y a aproximadamente 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 18 h, 30 h, 42 h, 66 h, y una vez en el día 6 ó 7. Las muestras deben anotarse con fecha y hora. Estas muestras son para estudios farmacocinéticos y para dosimetría. Los pacientes con eliminación retrasada tendrán una obtención de imágenes más realizada entre el día 9 y 11.

Momento	Procedimiento
Día -10	Inicio diario de SSKI oral, Cytomel para el bloqueo de la tiroides
Día 0	5 mCi de yodo-131 en 0,25 a 0,75 mg de 8H9* muestras de sangre a 0, y a aproximadamente 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h después de la inyección
Día 0	Escaneo con gammacámara más recuento de cuerpos completos
Día 1	Escaneo con gammacámara más recuento de cuerpos completos
Día 1	Muestras de sangre a aproximadamente 18 h y 30 h
Día 2	Escaneo con gammacámara más recuento de cuerpos completos
Día 2, 3	Muestras de sangre a aproximadamente 42 h y 66 h
Día 5 (o 6 ó 7)	Escaneo con gammacámara más recuento de cuerpos completos y muestra de sangre en el día 9 (o 10 u 11) si hay baja eliminación
	Escaneo con gammacámara más recuentos de cuerpos completos y muestra de sangre
Día 14	SSKI oral e interrupción de Cytomel
*Premedicación con acetaminofeno y difenhidramina.	

1.3.2 Los pacientes se someterán a gammagrafía los días 0, 1, 2 y 5 ó 6 ó 7 después de la inyección

1.3.3 Sangre para HAMA q 1-2 meses

1.3.4 Se recomienda biopsia de tejido para regiones de captación por obtención de imágenes con 8H9 y negativo por técnicas radiográficas convencionales

1.4.0 Bioestadística

Para medir el nivel de concordancia entre la modalidad de obtención de imágenes convencional (escaneos por CT, MRI y nuclear) y la obtención de imágenes de anticuerpo 8H9 en sitios conocidos y ocultos de enfermedad.

Las lesiones de referencia se confirmarán tanto por cirugía como por obtención de imágenes específicas de enfermedad (por ejemplo, MIBG para NB). Para cada individuo se puntuará la proporción de sitios encontrados por obtención de imágenes con 8H9. Dado que habrá confirmación por cirugía o por obtención de imágenes específica de enfermedad, para cada enfermedad pueden realizarse los análisis de sensibilidad de 8H9. Se calculará la probabilidad de concordancia o valor predictivo positivo. Los intervalos de confianza del 95% pueden calcularse dentro de $\pm 31\%$ para cada enfermedad (NB, RMS, ES/PNET, DSRT, tumores cerebrales y otros sarcomas). El estudio se realizará en un total de 60 pacientes (10 con NB, 10 RMS, 10 osteosarcomas, 10 ES, 10 DSRT y 10 tumores cerebrales más otros tumores positivos para 8H9). Los cálculos estimados en el nivel de concordancia y el nivel de captación tumoral se calcularán por separado en cada grupo de enfermedad. Los inventores no están usando estadística de Kappa para probar la asociación entre obtención de imágenes con ^{124}I -3F8 y otras modalidades de obtención de imágenes (CT, MRI) ya que sólo los pacientes con tumores medibles o evaluables tendrán derecho a elegir este protocolo. En otras palabras, los pacientes sin indicios de enfermedad por estudios convencionales no tendrán derecho a elegir. Por tanto, los inventores no pueden estimar la probabilidad de obtención de imágenes negativas con 8H9 cuando los estudios de obtención de imágenes negativas convencionales son negativos, es decir, el análisis de especificidad.

1.5.0 Preparación de ^{131}I -8H9

8H9 se produce bajo condiciones de GMP y se envasa en viales de cristal. ^{131}I se compra de Amersham Inc. 8H9 se marcará con yodo radiactivo usando el procedimiento de yodogen T. La mezcla de reacción se filtra a través de un filtro de intercambio iónico (AG1X8) (Biorad) para eliminar el yodo libre. La incorporación de proteínas se mide usando precipitación de TCA o cromatografía en capa fina. La inmunorreactividad se mide por 2 procedimientos separados (1) una técnica de radioinmunoensayo de microtítulos en fase sólida previamente descrita¹⁰² y (2) procedimiento de desplazamiento del pico antiidiotípico, en el que el anticuerpo antiidiotípico 2E9 se añade a una relación molar 50 a 1 a ^{131}I -8H9 durante 30 minutos sobre hielo con mezclado. Las cpm en porcentaje desplazadas en HPLC es una medida de la inmunorreactividad. El 8H9 radioyodado tiene una precipitabilidad media de ácido tricloroacético de $>90\%$, y la actividad específica de ^{131}I -8H9 promedia 10 mCi por mg de proteína. La administración de ^{131}I -8H9 se realiza en el plazo de 1-2 horas desde la yodación para reducir la posibilidad de radiolisis. El radiomarcado de anticuerpos se lleva a cabo en el Laboratorio central de isótopos bajo la supervisión del Dr. Ronald Finn según pautas de la FDA sobre productos biológicos radiomarcados para uso humano.

1.6.0 Infusión de la preparación de anticuerpos radiomarcados y monitorización de la respuesta de pacientes en el periodo inmediato después de la infusión, que incluye tratamiento poshospitalario de seguridad con radiación

Todas las preparaciones de MoAb radiomarcados serán inyectadas a pacientes por una enfermera o médico de investigación. Se realizará una observación estricta de las pautas apropiadas de seguridad con radiación. El procedimiento se explicará al paciente minuciosamente antes de la infusión por el médico, y se comprobará el pretratamiento apropiados (por ejemplo, gotas de SSKI, Perchloracap). El anticuerpo radiomarcado será transportado por el médico desde el laboratorio de radiomarcado hasta el área de infusión cargado en el sistema de administración de la infusión. El médico y la enfermera estarán presentes durante toda la infusión y en el periodo después de la infusión.

El procedimiento de infusión estará constituido por el anticuerpo radiomarcado que se administra intravenosamente tanto por un catéter intravenoso periférico como un catéter central permanente durante un periodo de 20 minutos. Se monitorizarán todas las constantes vitales de los pacientes antes de y tras la infusión de los anticuerpos radiomarcados. Se obtendrán muestras de sangre para el cálculo farmacocinético inmediatamente tras la infusión, y a diversos momentos de tiempo después como se ha explicado resumidamente anteriormente. El paciente será observado diariamente por un médico mientras esté hospitalizado, y estará disponible para consulta (con personal apropiado de seguridad de la radiación) con un oncólogo o enfermera referente a asuntos relacionados con la infusión de los anticuerpos radiomarcados o la seguridad de la radiación. También se obtendrán imágenes del paciente en el Departamento de Medicina nuclear durante el posterior periodo de dos semanas, y todos los procedimientos de obtención de imágenes realizados serán supervisados por el médico para garantizar que se obtienen los estudios apropiados.

1.7.0 Radioinmunoensayo *in vitro*, ELISA e inmunotinción

Se llevarán a cabo ensayos *in vitro* cuantitativos en fluidos biológicos recogidos durante el transcurso de los estudios de investigación clínica en pacientes individuales que emplean anticuerpos radiomarcados. Los procedimientos proporcionados incluirán recuento gamma de muestras de sangre y ensayos de HAMA. El título de HAMA en sangre y suero guardará relación con la eliminación de ^{131}I -8H9.

1.7.1 Procedimientos generales de recuento

Se contarán alícuotas de sangre completa/plasma/suero obtenidas de pacientes infundidos con anticuerpos radiomarcados en un contador gamma con patrones de actividad conocida para la determinación de la actividad de muestras. Las muestras de tejido obtenidas por biopsia o cirugía también se contarán en un contador gamma para la determinación del % de dosis inyectada/gramo de tejido. Se observarán procedimientos de control de calidad apropiados para instrumentos de recuento y especímenes de tejido.

1.7.2 Determinación cuantitativa de HAMA por ELISA

La presencia de HAMA puede modificar la biodistribución de ^{131}I -8H9. Aunque en pacientes sin tratamiento previo HAMA es normalmente indetectable, en pacientes con historia anterior de exposición a anticuerpos murinos o a 8H9, la presencia de HAMA antes y poco y poco después de la inyección de 8H9 necesitará monitorizarse. Además, la formación de HAMA guardó una alta relación con la supervivencia de pacientes en el sistema GD2-3F8, los inventores planean medir el título de anticuerpo en suero 6 meses y 12 meses después de la exposición a 8H9. Previamente se ha descrito el procedimiento de ELISA¹¹. Usando fragmentos F(ab')₂ derivados de los tres anticuerpos antiidiotípicos (2E9, 1E12 y 1F11), el Ab3 en suero también se monitorizará como se ha demostrado previamente para el sistema GD2-3F8^{103,104}.

1.7.3 Determinación cuantitativa de antígeno libre en circulación

Como la biodistribución de 8H9 será enormemente afectada por cualquier antígeno soluble, los sueros de pacientes antes de la inyección de anticuerpo se analizarán para antigenemia usando un ensayo de inhibición de ELISA usando una modificación del procedimiento previamente descrito¹⁰⁵. Los pocillos de microtitulación se recubren de MoAb antiidiotípico 2E9. Se usan diluciones de suero seriadas para inhibir la unión de 8H9 biotinilado, que puede detectarse por peroxidasa-estreptavidina. Tras el lavado, la reacción de color se realiza a temperatura ambiente usando peróxido de hidrógeno como sustrato y o-fenilendiamina (Sigma, St. Louis, MO) como cromógeno. Después de detener la reacción con 30 ul de ácido sulfúrico 5 N, la densidad óptica de los pocillos se lee entonces usando el lector de placas MRX (Dy nex, Chantilly, VA) y el título de anticuerpos se calcula en unidades/ml.

1.7.4 Inmunotinción de tejidos tumorales

Los tejidos tumorales se probarán para la expresión de antígenos usando procedimientos previamente descritos⁷⁴.

Resultados previstos y posibles dificultades

La inyección de ^{131}I -8H9 intravenosamente o intratecalmente en monos cinomolgos fue bien tolerada. Aunque los inventores no prevén ningún efecto secundario perjudicial, los pacientes se monitorizarán cercanamente durante la infusión de anticuerpos con oxígeno, antihistaminas, epinefrina e hidrocortisona en la cama. Después de completarse la inyección de anticuerpos, los pacientes se observarán durante al menos 1 hora antes de recibir el alta de la clínica. Los pacientes con grado 3-4 inesperado (distinto de urticaria, cambios de tensión arterial/pulso/temperatura que remiten espontáneamente) o cualquier toxicidad potencialmente mortal informarán inmediatamente al IRB y la FDA. Dada la labilidad del antígeno en frío (tanto si está libre como unido a la célula), la inmunorreactividad y el antígeno tumoral soluble se ensayarán usando el anticuerpo antiidiotípico como imitador de antígeno. Los anticuerpos antiidiotípicos son MoAb IgG1 de rata purificado por elución de ácido de columnas de afinidad en proteína G.

Han seguido siendo estables a pesar del tratamiento con ácido, cambios de tampón y congelación y descongelación. Los antígenos solubles pueden interferir con la elección de dianas tumorales. *In vitro*, el suero de pacientes no inhibió la unión de 8H9 a su anticuerpo antiidiotípico. La inmunofluorescencia indirecta de un espectro de líneas celulares mostró persistencia de antígeno y anticuerpo sobre la superficie celular a 37°C durante días. En estudios de biodistribución de xenoinjertos no hubo indicios de eliminación de antígenos que interfirieran con la obtención de imágenes de tumores. Aunque la interferencia de la biodistribución de 8H9 por antígeno soluble es poco probable, los inventores documentarán la ausencia por el ensayo de inhibición de ELISA. La respuesta de HAMA dentro de las dos primeras semanas después de la inyección de MoAb se observa rara vez entre la población de pacientes de los inventores, en parte debido a la intensidad de la quimioterapia que recibieron. Sin embargo, se espera que algunos organicen una respuesta de HAMA cuando se obtienen imágenes una segunda vez. Claramente, su HAMA se monitorizará antes y después de la inyección con el fin de interpretar los resultados de biodistribución. Debido a esta sensibilización, estos pacientes no tienen el derecho a elegir posteriores terapias de MoAb (como se establece en el formulario de consentimiento). Sin embargo, los inventores plantean como hipótesis que esta respuesta de HAMA ayudará a inducir la red de idiotipo, que puede tener beneficio en la supervivencia de pacientes, análogo al éxito de los inventores con el sistema 3F8-GD2 murino que describen los inventores en resultados preliminares y el informe de progreso.

Interpretaciones e implicaciones

La capacidad de 8H9 para detectar una amplia clase de tumores sólidos primarios y metastásicos será la primera etapa en la definición de la utilidad clínica del MoAb 8H9 *in vivo*. Además de ser una herramienta de diagnóstico útil, su potencial terapéutico necesitará ser explorado. Claramente, la cantidad de anticuerpo depositado en diversos órganos necesita ser tenido en cuenta si estos anticuerpos se usan para administrar radioisótopos, enzimas o fármacos. También se explorarán anticuerpos quiméricos con funciones efectoras de Fc mejoradas e inmunogenia reducida. Las inmunocitocinas y los cuerpos T también son posibles etapas en el futuro desarrollo de estos agentes.

Nº 2: Para estimar la dosis de radiación por mCi de ^{131}I -8H9 administrado a tumores y a órganos normales en pacientes.

Para obtener los datos necesarios para la dosimetría de pacientes, los pacientes se inyectarán intravenosamente con ^{131}I -8H9 según su área superficial, es decir, 10 mCi/1,73 m². Se obtendrán un total de tres o cuatro imágenes de

ES 2 357 425 T3

5 gammacámaras en el plazo de un periodo de 1 a 2 semanas tras la inyección. Se recomienda el siguiente programa, pero puede alterarse si fuera necesario: 1-4 h después de la inyección (día 0) y luego de nuevo en los días 2, día 3 y día 6 ó 7. Si se garantiza, debido a la lenta cinética de eliminación, también puede realizarse la obtención de imágenes en los días 9, 10 u 11. Usando este programa puede evitarse la obtención de imágenes el fin de semana independientemente del día de la semana inyectado. Los tipos de escaneo y los parámetros de obtención de imágenes se enumeran a continuación:

2.1 Obtención de datos

10 Las imágenes de SPOT y SPECT se recogerán durante lesiones tumorales “de referencia” preseleccionadas como se identifica a partir de las imágenes de CT o MR previamente obtenidas.

2.1.1 Obtención de sangre

15 Las muestras de sangre se recogerán del siguiente modo: antes de la inyección, y a 0, 15, 30 min, luego 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 18 h o 30 h, 42 h, 66 h, día 6 ó 7 tras la inyección. El plasma o suero se recogerá y se contará a partir de cada muestra y los resultados se expresarán como porcentaje de la radiactividad inyectada por l de suero o volumen de sangre.

20	Vista de punto estático (SPOT)			
	Colimación de HEHR			
	Tiempo de adquisición de 10 a 20 min			
	Adquisición de ventana dual para la corrección de dispersión			
25	Tamaño de la matriz 128 x 128 x 16			
	SPECT			
	Colimación de HEHR			
	6 grados o 64 vistas en parada y disparo, modo de órbita elíptica			
30	1 a 4 min/vista (tiempo de adquisición de 0,5 a 2 h en una cámara de doble cabezal)			
	Adquisición de ventana dual para la corrección de dispersión			
	Tamaño de la matriz 64 x 64 x 16			
	Barrido de cuerpo entero (SWEEP)			
35	Colimación de alta energía, alta resolución (HEHR)			
	8 a 12 cm/min de velocidad de barrido (tiempo de adquisición de 20 a 25 min)			
	Adquisición de ventana dual para la corrección de dispersión			
	Tamaño de la matriz 256 x 1024 x 16			
40	Programa de obtención de imágenes:			
	Día de obtención de imágenes	SWEEP	SPOT	SPECT
	0	X	X	
	1,2	X	X	X
	5, 6 ó 7	X	X	
45	9, 10 u 11	X	X	

2.1.2 Modelado farmacocinético

50 Curvas de tiempo-actividad en sangre de muestras de sangre seriadas y de ROI alrededor de imágenes de SPECT secuenciales del corazón (cuando estaban disponibles). Estos datos se ajustarán, junto con la cinética de eliminación del cuerpo completo, a un modelo farmacocinético de distribución de anticuerpos. Los modelos previamente desarrollados se han usado para este tipo de análisis, se han publicado más detalles referentes a la solución¹⁰⁶.

2.1.3 Dosimetría específica de paciente (3D-ID)

55 Se combinarán datos farmacocinéticos obtenidos de SPECT y la obtención de imágenes simples y el muestreo de sangre con información de la obtención de imágenes anatómicas (MR o CT) para estimar la dosis absorbida por el tumor y los órganos normales seleccionados que se esperarían de una inyección terapéutica de ¹³¹I-8H9. La metodología para esto se ha descrito previamente¹⁰⁷⁻¹¹⁵.

2.2 Determinaciones del volumen tumoral

65 Los volúmenes tumorales se determinarán a partir de CT o MRI si están disponibles. Los pacientes con enfermedad conocida en otros sitios se someten a obtención de imágenes en áreas adicionales. Todas las imágenes de CT se transferirán para mostrarse en imágenes de 3D-ID; las imágenes obtenidas en el MSKCC se transferirán digitalmente, la película de otras instituciones se escaneará usando un escáner de películas digital Lumisys. Usando 3D-ID, el radiólogo asesor revisará las imágenes con el técnico de la investigación. Entonces, el técnico de la investigación

dibujará contornos alrededor de las regiones de los tumores; los contornos serán revisados por el radiólogo asesor y se ajustarán, si se necesita. En algunos casos, la enfermedad puede representarse por un conjunto de nodos positivos muy pequeños; en estos casos se dibujará un contorno alrededor del grupo y se usará en la evaluación del volumen. La determinación del volumen usando 3D-ID se realiza sumando las áreas de regiones que han sido definidas por el usuario en todas las rebanadas que completan el tumor. Esta solución general ha sido previamente validada por CT. Aunque posiblemente es muy laborioso, un procedimiento específico de trazado de tumores tal es significativamente más preciso que las técnicas basadas en diámetros mayores y menores (es decir, modelos elipsoides). Se han examinado los errores asociados a la estimación de volumen basada en CT y los factores que influyen en estos errores y se considerarán en las determinaciones de volumen descritas anteriormente. No podrá conseguirse un tumor del cuerpo total fidedigno para todos los pacientes tanto debido al pequeño volumen de la enfermedad como para casos en los que las lesiones detectadas por SPECT no sean visibles por CT.

2.3 Dosimetría de médula roja

La dosimetría de médula ósea se realizará según las pautas recomendadas descritas en las recomendaciones de la AAPM¹¹⁶, es decir, las curvas de tiempo-actividad en sangre se multiplicarán por el factor apropiado (0,2 - 0,4) para derivar curvas de tiempo-actividad de la médula y dosis absorbida por la médula roja. Para los cálculos se usarán factores S proporcionados en MIRDose 3. Estos datos se compararán con la medición directa de la actividad de la médula de ROI extraídas por las cavidades de la médula en imágenes de SPECT. La capacidad cuantitativa de SPECT permitirá que los inventores verifiquen la precisión de la dosimetría de médula ósea determinada a partir de niveles de actividad y la tasa de eliminación de anticuerpo de la médula a partir del análisis convencional de muestras de sangre seriadas.

2.4 Dosimetría tridimensional

Para realizar dosimetría 3D, primero es necesario registrar un conjunto de imágenes de medicina nuclear (SPECT) que representan la distribución de anticuerpos radiomarcados para una modalidad de obtención de imágenes anatómicas (CT o MRI). Los inventores tienen una extensa experiencia con la implementación clínica del procedimiento de Pelizzari y Chen¹¹⁷. Esta técnica requiere que el usuario delimite la misma superficie en ambos conjuntos de modalidades de obtención de imágenes. Cuando sea necesario se realiza un estudio de transmisión de SPECT para obtener la superficie apropiada. El programa intenta maximizar la correlación de un conjunto de varios cientos de puntos sobre la superficie como se identifican en un escaneo (el "sombrero") con un modelo sólido de la misma superficie derivada del otro escaneo (la "cabeza"). Se usa una búsqueda por mínimos cuadrados no lineales para minimizar la suma de los cuadrados de las distancias desde cada punto de "sombrero" hasta el punto más próximo sobre la superficie de "cabeza". Las coordenadas del "sombrero" están traducidas, rotadas y escaladas para proporcionar el mejor ajuste. Los usuarios pueden controlar qué parámetros se varían durante la búsqueda. Entonces, el conjunto final de transformaciones se usa para convertir las coordenadas de una imagen en las de la otra. Los estudios fantasma indican que la técnica de Pelizzari y Chen para el registro de SPECT a CT es exacta hasta dentro de 3 mm. El Servicio de Medicina nuclear en el MSKCC ha realizado tal registro para más de 100 estudios de pacientes. El paquete de Pelizzari y Chen también ha sido usado para el registro de estudios torácicos y abdominales por Chen y sus colaboradores en la Universidad de Chicago (comunicación personal). Tanto el grupo de Chicago como los inventores también han incluido contornos para hígado y/o bazo junto con los contornos del cuerpo. Esto mejora adicionalmente el registro proporcionando más contornos para el algoritmo de minimización. En algunos casos también se ha usado una banda radiactiva como ayuda para el registro¹¹⁷. Los inventores están actualmente comparando este procedimiento con algoritmos alternativos para el registro de imágenes para las imágenes completas¹¹⁷⁻¹²⁰.

Pueden usarse imágenes de SPECT seriadas interdependientes para determinar las distribuciones de actividad acumulada ajustando e integrando una captación y/o eliminación exponencial a la actividad específica dentro de una ROI sobre el tumor u órgano. Puede tenerse en cuenta la variación en la actividad dentro de los vóxeles individuales mediante una suma ponderada de los recuentos/actividad dentro del vóxel correspondiente con el tiempo. Dada una distribución tal de la actividad acumulada se ha desarrollado un paquete de software, 3D-ID, para calcular la distribución de dosis. Los contornos diana se dibujan en rebanadas de imágenes de SPECT y CT/MR alargadas yuxtapuestas que se seleccionan de una visualización de imagen desplazable. Los contornos dibujados en una modalidad aparecen simultáneamente en la otra. El usuario puede cambiar entre modalidades colocando el cursor en la ventana apropiada. Esto proporciona el uso simultáneo de tanto modalidades de obtención de imágenes para definir el tumor (por ejemplo, usando SPECT) como contornos de órganos normales (usando CT/MR). La dosis para todos los vóxeles dentro del volumen diana se obtiene convolucionando la distribución de actividad con una tabla de núcleos puntuales de dosis absorbida frente a la distancia. Los factores S específicos de paciente pueden calcularse definiendo contornos de órganos fuente y asignando actividad unitaria a todos los vóxeles dentro de cada fuente. La "dosis" para una diana dada es, por tanto, el factor S específico de paciente. Los histogramas de dosis y el órgano específico de paciente y los factores S de tumor generados usando 3D-ID en combinación con SPECT proporcionarán una importante información para el entendimiento de la respuesta tumoral y la toxicidad del órgano en radioinmunoterapia.

Recientemente se han publicado núcleos de dosis de fotones para 14 radionúclidos de interés en terapia de emisores internos¹¹². La expresión explícita de núcleos de dosis de fotones de radionúclidos necesaria para la dosimetría tridimensional no estaba previamente disponible. Los inventores describieron recientemente la estructura global y las metodologías de un paquete de software para cálculos de dosimetría interna tridimensional (3D-ID)^{107,113}. Se detallaron una serie de módulos de software que abordan los problemas logísticos de realizar dosimetría tridimensional especí-

fica de paciente. Se han desarrollado herramientas de software para combinar imágenes de diferentes modalidades, definir regiones de interés usando datos de multimodalidad disponibles e identificar volúmenes fuente y diana para dosimetría. Se ha implementado un cálculo de dosimetría basado en nódulos puntuales y también se describieron varias soluciones diferentes para mostrar la distribución espacial de dosis absorbida en un modo biológicamente pertinente. El propio cálculo de dosis se llevó a cabo en un módulo separado de manera que con 3D-ID pudieran usarse diferentes esquemas de cálculo que incluyen Monte Carlo.

2.5 Resultados previstos

Las fuentes principales de error al llevar a cabo los cálculos de dosis absorbida son: 1. Inexactitudes en los cálculos estimados de concentración de actividad derivados de la obtención de imágenes. 2. Desigualdad entre anatomía estándar (usada para los cálculos de dosimetría) y anatomía de pacientes individuales. 3. Suposición de uniformidad en la distribución espacial de radiactividad en tanto una escala microscópica (mm a mm) como macroscópica (cm). Cuando se aplican soluciones convencionales (Comité de MIRD) para estimar la dosis absorbida se entiende que el cálculo estimado se deriva de un modelo que incluye un cierto número de suposiciones. Esta solución ha sido suficiente en la estimación de dosis para aplicaciones de diagnóstico en las que las dosis típicas ya están muy por debajo de la toxicidad. Sin embargo, un objetivo de la radioinmunoterapia es tratar para la tolerancia de órganos normales. En un escenario tal, la dosimetría específica de paciente exacta es crítica. Las metodologías de dosimetría que se usarán en esta propuesta abordan el punto 2 y una parte del punto 3; los cálculos de dosis se realizan para geometrías de pacientes individuales y la distribución espacial de radiactividad en órganos tumorales o normales se explica a una escala macroscópica (cm). En el pasado, el uso de cinética de obtención de imágenes planas para proyectar la cinética de la distribución espacial tuvo dificultades adicionales. Aunque las determinaciones de actividad basadas en SPECT son una etapa hacia adelante, los inventores esperan que estas inexactitudes en la obtención de imágenes derivadas de la actividad se reduzcan adicionalmente cuando se use tomografía de emisión de positrones con I-124-8H9. Ésta es un área de desarrollo activo en el Memorial Sloan Kettering en la última década¹²¹.

La dosimetría convencional proporciona cálculos estimados de la dosis absorbida, promediada con respecto a un volumen de órgano normal o tumor. La metodología implementada en esta propuesta dará la distribución espacial de dosis absorbida como contornos de isodosis recubiertos por un conjunto de imágenes de CT 3-D. Esto hace posible evaluar la distribución de dosis absorbida anatómica por los tejidos y, a partir de esto, evaluar el posible impacto en términos de toxicidad. Por ejemplo, la dosis para el tejido circundante de la actividad que se ha concentrado en un tumor contenido dentro de un órgano normal puede obtenerse por este medio.

2.6 Interpretaciones e implicaciones

La dosis absorbida promedio por un tumor puede no reflejar la posible eficacia terapéutica y el encogimiento del tumor. Esa porción de un volumen tumoral que recibe la menor dosis absorbida conducirá a un fracaso del tratamiento independientemente de la dosis administrada a otras regiones del volumen tumoral. El paquete de software 3D-ID proporciona información detallada referente a la distribución espacial de las dosis absorbidas dentro de un volumen diana. Esta información se representa como histogramas de dosis-volumen, en los que la fracción de volumen tumoral que recibe una dosis absorbida particular se representa frente a la dosis absorbida. Usando tal información será posible evaluar mejor la probabilidad del control de tumores. Por ejemplo, si la dosis promedio con respecto a un volumen tumoral es 2 a 3 Gy y una región pequeña dentro de este volumen sólo recibe 0,1 Gy, entonces el tratamiento será insatisfactorio.

Referencias

1. DiMaggio J J, Scheinberg D A, Houghton A N: Monoclonal antibody therapy of cancer. In: Pinedo HM, Chabner BA, Longo DL, (eds.): Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, Annual 11, Elsevier Science Publishers B.V., (Biomedical Division), 1990, pp 177-203.
2. Schlom J: Monoclonal Antibodies in cancer therapy: Basic principles. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, (eds.): Biologic therapy of cancer, 2nd ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Co, 1995, pp 507-520.
3. Koehler G, Milstein C: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-496, 1975.
4. Moffat R, Pinsky C M, Hammershaimb L, et al: Clinical utility of external immunoscintigraphy with the IMM-4 technetium-99m Fab' antibody fragment in patients undergoing surgery for carcinoma of the colon and rectum: results of a pivotal, phase III trial. The Immunomedics Study Group. *J Clin Oncol* 14(8):2295-2305, 1996.
5. Maloney D G, Grillo-Lopez A J, Bodkin D J, et al: IDEC-C2B8: Results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 15:3266-3274, 1997.
6. Cobleigh M A, Vogel C L, Tripathy D, et al: Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17:2639-2648, 1999.

7. **Bigner D D, Brown M T, Friedman A H:** Iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas:phase I trial results. *Journal Clinical Oncology* 16:2202-2212, 1998.
- 5 8. **Jurcic J G, Caron P C, Miller W H:** Sequential targeted therapy for acute promyelocytic leukemia with all-transretinoic acid and anti-CD33 monoclonal antibody M195. *Leuk* 9:244-248, 1995.
9. **Meredith R F, Khazaeli M B, Plott W E:** Phase II study of dual 131I-labeled monoclonal antibody therapy with interferon in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Can Res* 2:1811-1818, 1996.
- 10 10. **Yeh S D, Larson S M, Burch L, et al:** Radioimmunodetection of neuroblastoma with iodine-131-3F8: Correlation with biopsy, iodine-131-Metaiodobenzylguanidine (MIBG) and standard diagnostic modalities. *J Nucl Med* 32:769-776, 1991.
- 15 11. **Cheung N K V, Kushner B H, Cheung I Y, et al:** Anti-GD2 antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. *J Clin Oncol* 16:3053-3060, 1998.
12. **Wheldon T E, O'Donoghue J A, Barrett A, Michalowski A S:** The curability of tumors of differing size by targeted radiotherapy using 131-I or 90-Y. *Radiother Oncol* 21:91-99, 1991.
- 20 13. **Wilder R B, DeNardo G L, DeNardo S J:** Radioimmunotherapy: recent results and future directions. *J Clin Oncol* 14:1383-1400, 1996.
14. **Zalutsky M R, McLendon R E, Garg P K, et al:** Radioimmunotherapy of neoplastic meningitis in rats using an alpha-particle-emitting immunoconjugate. *Cancer Res* 54:4719-4725, 1994.
- 25 15. **McDevitt M R, Sgouros G, Finn R D, et al:** Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med* 25:1341-1351, 1998.
16. **Lode H N, Xiang R, Becker J C, et al:** Immunocytokines: A promising approach to cancer immunotherapy. *Pharmacology Therapeutics* 80:277-292, 1998.
- 30 17. **DeNardo S J, DeNardo G L, DeNardo D G, et al:** Antibody phage libraries for the next generation of tumor targeting radioimmunotherapeutics. *Clin Can Res* 5:3213s-3218s, 1999.
- 35 18. **DeNardo S J, DeNardo G L, Brush J, Carter P:** Phage Library-derived human anti-TETA anti anti-DOTA ScFv for pretargeting RIT. *Hybridoma* 18:13-21, 1999.
19. **Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler D G:** Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:720-24, 1993.
- 40 20. **Altenschmidt U, Kahl R, Moritz D, et al:** Cytolysis of tumor cells expressing the Neu/erbB-2, erbB-3, and erbB-4 receptors by genetically targeted naive T lymphocytes. *Clin Can Res* 2:1001-1008, 1996.
- 45 21. **Krause A, Guo H F, Tan C, et al:** Antigen-dependent C D-28 signaling enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *J Exp Med* 188:619-626, 1998.
22. **Garin-Chesa P, Fellinger E J, Huvos A G:** Immunohistochemical analysis of neural cell adhesion molecules. *Am J Pathol* 139:275-286, 1991.
- 50 23. **Ritter G, Livingston P O:** Ganglioside antigens expressed by human cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2:401-409, 1991.
24. **Wikstrand C J, Longee D C, McLendon R E, et al:** Lactotetraose series ganglioside 3',6'-isoLD1 in tumors of central nervous and other systems *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 53:120-126, 1993.
- 55 25. **Seeger R C, Danon Y L, Rayner S A, Hoover F:** Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. *J Immunol* 128:983-989, 1982.
- 60 26. **Ylagan, Quinn L R:** B: CD44 expression in astrocytic tumors. *Modem Pathology* 10:1239-1246, 1997.
27. **Kaaijp P, Troost D, Morsink F, et al:** Expression of CD44 splice variants in human primary brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology* 26:185-190, 1995.
- 65 28. **Richardson R B, Davies A G, Bourne S P, et al:** Radioimmunolocalization of human brain tumors. Biodistribution of radiolabelled monoclonal antibody UJ13A. *Eur J Nucl Med* 12:313-320, 1986.

29. **Papanastassiou V, Pizer B L, Coakham H B, et al:** Treatment of recurrent and cystic malignant gliomas by a single intracavitary injection of ¹³¹I-monoclonal antibody: Feasibility, pharmacokinetics and dosimetry. *Br J Cancer* 67:144-151, 1993.
- 5 30. **Kishima H, Shimizu K, Tamura K, et al:** Monoclonal antibody ONS-21 recognizes integrin $\alpha 3$ in gliomas and gliomas and medulloblastomas. *Br J Cancer* 79:333-339, 1998.
- 10 31. **Moriuchi S, Shimizu K, Miyao Y, Hayakawa T:** Characterization of a new mouse monoclonal antibody (ONSM21) reactive with both medulloblastomas and gliomas. *Br J Cancer* 68:831-837, 1993.
32. **Erikson H P, Lighter V A:** Hexabrachion protein (tenascin, cytactin, brachionectin) in connective tissues, embryonic tissues and tumors. *Adv Cell Biol* 2:55-90, 1988.
- 15 33. **Riva P, Franceschi G, Frattarelli M, et al:** ¹³¹I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma- phase I and II study. *Acta Oncol* 38:351-359, 1999.
34. **Kuan C T, Reist C J, Foulon C F, et al:** ¹²⁵I-labeled anti-epidermal growth factor receptor vIII single-chain Fv exhibits specific and high-level targeting of glioma xenografts. *Clin Can Res* 5:1539-1549, 1999.
- 20 35. **Wikstrand C J, Hale L P, Batra S K, et al:** Monoclonal Antibodies against EGFRvIII are Tumor Specific and React with Breast and Lung Carcinomas and Malignant Gliomas. *Cancer Res* 55:3140-48, 1995.
36. **Kondo S, Miyatake S, Iwasaki K, et al:** Human glioma-specific antigens detected by monoclonal antibodies. *Neurosurgery* 30:506-511, 1992.
- 25 37. **Dastidar S G, Sharma S K:** Monoclonal antibody against human glioblastoma multiforme (U-87Mg) immunoprecipitates a protein of monoclonal mass 38KDa and inhibits tumor growth in nude mice. *J Neuroimmuno* 56:91-98, 1995.
- 30 38. **Mihara Y, Matsukado Y, Goto S, et al:** Monoclonal antibody against ependymoma-derived cell line. *Journal of Neuro-Oncology* 12:1-11, 1992.
39. **Wang N P, Marx J, McNutt M A:** Expression of myogenic regulatory proteins (myogenin and MyoD1) in small blue round cell tumors of childhood. *Am J Pathol* 147:1799-1810, 1995.
- 35 40. **Weidner N, Tjoe J:** Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13 that recognizes glycoprotein 930/32MIC2 and is useful in diagnosing ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma. *American Journal of Surgical Pathology* 18:486-494, 1994.
- 40 41. **Wedner N, Tjoe J:** Immunohistochemical profile of monoclonal antibody O13 that recognizes glycoprotein 930/32MIC2 and is useful in diagnosing ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma. *Am J Pathol* 18:486-494, 1994.
42. **Heiner J, Miraldi FD, Kallick S, et al:** *In vivo* targeting of GD2 specific monoclonal antibody in human osteogenic sarcoma xenografts. *Cancer Res* 47:5377-5381, 1987.
- 45 43. **Price M R, Campbell D G, Robyn R A:** Characteristics of the cell surface antigen p72, associated with a variety of human tumors and mitogen-stimulated T-lymphoblasts. *FEBS Letters* 171:31-35, 1984.
- 50 44. **Spendlove I, James L L, Carmichael J, Durrant L G:** Decay accelerating factor (CD55): a target for cancer vaccines? *Cancer Res* 59:2282-2286, 1999.
45. **Gorlick R, Huvos A G, Heller G, et al:** Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 17:2781-2788, 1999.
- 55 46. **Bruland O, Fodstad O, Funderud S, Pihl A:** New monoclonal antibodies specific for human sarcomas. *Int J Cancer* 15:27-31, 1986.
47. **Cheung N K, Saarinen U M, Neely J E, et al:** Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 45:2642-2649, 1985.
- 60 48. **Modak S, Gultekin S H, Kramer K, et al:** Novel tumor-associated surface antigen: broad distribution among neuroectodermal, mesenchymal and epithelial tumors, with restricted distribution in normal tissues. *Proceedings of ASCO* 17:449a, 1998.
- 65 49. **Cheung N K, Heller G, Kushner B H, et al:** Detection of metastatic neuroblastoma in bone marrow: when is routine marrow histology insensitive? *J Clin Oncol* 15:2807-2817, 1997.

50. **Ghossein R A, Osman I, Bhattacharya S, et al:** Detection of circulating prostatic tumor cells using immuno-bead reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostatic specific membrane antigen mRNA. *Diag Mol Path* 8:59-65, 1999.

51. **Leung W, Chen A R, Klann R C, et al:** Frequent detection of tumor cells in hematopoietic grafts in neuroblastoma and ewing's sarcoma. *Bone Marrow Transpl* 22:971-979, 1998.

52. **Mueller B M, Romerdahl C A, Gillies S D, Reisfeld R A:** Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. *J Immunol* 144:1382-1386, 1990.

53. **Santos A D, Kashmiri V S, Horan P H, et al:** Generation and characterization of a single gene-encoded singlechain-tetravalent antitumor antibody. *Clin Can Res* 5:3118s-3123s, 1999.

54. **Guo H F, Rivlin K, Dubel S, Cheung N K V:** Recombinant anti-ganglioside GD2 scFv-streptavidin fusion protein for tumor pretargeting. *Proc Am Assoc Cancer Res* 37:469, 1996 (abstract).

55. **Fagnou C, Michon J, Peter M, et al:** Presence of tumor cells in bone marrow but not in blood is associated with adverse prognosis in patients with ewing's tumor. *J Clin Oncol* 16:1707-1711, 1998.

56. **Cheung N K, Kushner B H, LaQuaglia M, Lindsley K:** Treatment of advanced stage neuroblastoma. In: Reghavan D, Scher HI, Leibel SA, Lange P, (eds.): Principles and Practice of Genitourinary Oncology. Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1997, pp 1101-1111.

57. **Brodeur G M, Castleberry R P:** Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, (eds.): Principles and Practice of Pediatric Oncology, 3rd ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1997, pp 761-797 chapter 29.

58. **Cheung N K V:** Biological and molecular approaches to diagnosis and treatment. section I. Principles of Immunotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG, (eds.): Principles and Practice of Pediatric Oncology, 3rd ed. ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1997, pp 323-342.

59. **Larson S M, Sgouros G, Cheung N K:** Antibodies in cancer therapy: Radioisotope conjugates. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, (eds.): Biologic Therapy of Cancer, 2nd ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Co., 1995, pp 534-552.

60. **Levy R, Miller R A:** Antibodies in cancer therapy: B-cell lymphomas. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, (eds.): Biologic therapy of cancer, 1st ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Co, 1991, pp 512-522.

61. **Reisfeld R A, Mueller B M, Handgretinger R:** Potential of genetically engineered anti-ganglioside GD2 antibodies for cancer immunotherapy. In: Progress in Brain Search (Svennerhol,L, Asbury,AK, Reisfeld,RA, Sandhoff,K, Suzuki, K, Tettamani,G, Toffano,G, vol. 101. Cambridge, UK, Elsevier Trends Journals, 1994, pp 201-212.

62. **Munn D H, Cheung N K:** Interleukin-2 enhancement of monoclonal antibody-mediated cellular cytotoxicity (ADCC) against human melanoma. *Cancer Res* 47:6600-6605, 1987.

63. **Hank J A, Robinson R R, Surfus J, et al:** Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following *in vivo* therapy with recombinant interleukin-2. *Cancer Res* 50:5234-5239, 1990.

64. **Kushner B H, Cheung N K:** GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma. *Blood* 73:1936-1941, 1989.

65. **Kushner B H, Cheung N K V:** Absolute requirement of CD11/CD18 adhesion molecules, FcRII and phosphatidylinositol-linked FcRIII for monoclonal antibody-mediated neutrophil anti-human tumor cytotoxicity. *Blood* 79:1484-1490, 1992.

66. **Cheung N K V, Walter E I, Smith-Mensah W H, et al:** Decay-accelerating factor protects human tumor cells from complement-mediated cytotoxicity *in vitro*. *J Clin Invest* 81:1122-1128, 1988.

67. **Saarinen U M, Coccia P F, Gerson S L, et al:** Eradication of neuroblastoma cells *in vitro* by monoclonal antibody and human complement: method for purging autologous bone marrow. *Cancer Res* 45:5969-5975, 1985.

68. **Munn D H, Cheung N K:** Antibody-dependent antitumor cytotoxicity by human monocytes cultured with recombinant macrophage colony-stimulating factor. Induction of efficient antibody-mediated antitumor cytotoxicity not detected by isotope release assays. *J Exp Med* 170:511-526, 1989.

69. **Munn D H, Cheung N K:** Phagocytosis of tumor cells by human monocytes cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 172:231-237, 1990.

70. **Sabzevari H, Gillies S D, Mueller B M, et al:** A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppresses growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined immunodeficiency mice. *Proceeds of the National Academy of Science USA* 91:9626-9630, 1994.
- 5 71. **Murray J L, Cunningham J E, Brewer H M, et al:** Phase I trial of murine anti-ganglioside (GD2) monoclonal antibody (Mab) 14G2A in cancer patients. *J Biol Res Modif* 1991 (*Soc. Biol. Therapy Meeting Abstract* 1991).
72. **Ugur O, Kostakoglu L, Hui E T, et al:** Comparison of the targeting characteristics of various radioimmuno-conjugates for radioimmunotherapy of neuroblastoma: Dosimetry calculations incorporating cross-organ beta doses.
10 *Nucl Med Biol* 23:1-8, 1996.
73. **Mujoo K, Reisfeld R A, Cheung L, Rosenblum M G:** A potent and specific immunotoxin for tumor cells expressing disialoganglioside GD2. *Cancer Immunol Immunother* 34:198-204, 1991.
- 15 74. **Gottstein C, Schön G, Tawadros S, et al:** Antidisialoganglioside Ricin A-chain immunotoxins show potent antitumor effects *in vitro* and in a disseminated human neuroblastoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Cancer Res* 54:6186-6193, 1994.
75. **Holzer U, Bethge W, Krull F, et al:** Superantigen-staphylococcal-enterotoxin-A-dependent and antibody-targeted lysis of GD2-positive neuroblastoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 41:129-136, 1995.
- 20 76. **Cheung N K, Lazarus H, Miraldi F D, et al:** Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8- a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol* 5:1430-1440, 1987.
- 25 77. **Cheung N K, Lazarus H, Miraldi F D, et al:** Reassessment of patient response to monoclonal antibody 3F8. *J Clin Oncol* 10:671-672, 1992.
78. **Murray J L, Cunningham J E, Brewer H, et al:** Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J Clin Oncol* 12:184-193, 1994.
- 30 79. **Saleh M N, Khazaeli M B, Wheeler R H, et al:** Phase I trial of the chimeric anti-GD2 monoclonal antibody ch 14.18 in patients with malignant melanoma. *Human Antibodies Hybridomas* 3:19-24, 1992.
80. **Handgretinger R, Anderson K, Lang P, et al:** A phase I study of human/mouse chimeric anti-ganglioside GD2 antibody ch 14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31:261-267, 1995.
- 35 81. **Uttenreuther-Fischer M M, Huang C-S, Reisfeld R A, Yu A L:** Pharmacokinetics of anti-ganglioside GD2 mAb 14G2a in phase I trial in pediatric cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 41:29-36, 1995.
- 40 82. **Cheung N K V, Kushner B H, Yeh S J, Larson S M:** 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage IV neuroblastoma: a phase II study. In: Evans AE, Guillo JD, Biedler JL, et al, (eds.): *Advances in Neuroblastoma Research*, vol. 4. New York, Wiley Liss, 1994, pp 319-329.
83. **Yu A L, Gillies S D, Reisfeld R A:** Phase I clinical trial of ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma.
45 *Proc Am Soc Clin Oncol* 10:318, 1991.
84. **Handgretinger R, Baader P, Dopfer R, et al:** A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a. *Cancer Immunol Immunother* 35:199-204, 1992.
- 50 85. **Cheung N K:** Biological and Molecular Approaches to Treatment. Immunotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG, (eds.): *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 2nd ed. Philadelphia, J. B. Lippincott Company, 1992, pp 357-370.
86. **Miraldi F D, Nelson A D, Kraly C, et al:** Diagnostic imaging of human neuroblastoma with radiolabeled antibody. *Radiology* 161:413-418, 1986.
- 55 87. **Arbit E, Yeh S J, Cheung N K, Larson S M:** Quantitative Immunoinaging of gliomas in humans with anti-ganglioside monoclonal antibodies. *J Neurosurg* 76:399a, 1991.
- 60 88. **Daghighian F, Pentlow K S, Larson S M, et al:** Development of a method to measure kinetics of radiolabeled monoclonal antibody in human tumors with applications to microdosimetry: Positron emission tomography studies of iodine-124 labeled 3F8 monoclonal antibody in glioma. *Eur J Nucl Med* 20:402-409, 1993.
89. **Grant S C, Kostacoglu L, Kris M G, et al:** Radioimmunodetection of small-cell lung cancer using the anti-GD2 ganglioside monoclonal antibody 3F8: a pilot trial. *Eur J Nucl Med* 23:145-149, 1996.
- 65 90. **Cheung N K V, Kushner B H, Yeh S J, Larson S M:** 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage IV neuroblastoma: A phase II Study. *Int J Oncol* 12:1299-1306, 1998.

91. **Cheung N K, Yeh S D, Kushner B H, et al:** Phase I study of radioimmunotherapy of neuroblastoma using iodine 131 labeled 3F8. In: Prog. Clin. Biol. Res: Advances in Neuroblastoma Research 4. *New York, Wiley Liss, 1994*, pp 329.
92. **Larson S M, Pentlow K S, Volkow N D, et al:** PET scanning of iodine-124-3F8 as an approach to tumor dosimetry during treatment planning for radioimmunotherapy in a child with neuroblastoma. *J Nucl Med* 33:2020-2023, 1992.
93. **Pentlow K S, Graham M C, Lambrecht R M, et al:** Quantitative imaging of I-124 using positron emission tomography with applications to radioimmunodiagnosis and radioimmunotherapy. *Medical Physics* 18:357-366, 1991.
94. **Pentlow K S, Graham M C, Lambrecht R M:** Quantitative imaging of iodine-124 with PET. *J Nucl Med* 37:1557-1562, 1996.
95. **Lewellen T K, Kohlmyer S G, Miyaoka R S, Kaplan M S:** Investigation of the performance of the general electric advance positron emission tomograph in 3 D mode. *Transplantation Nuclear Science* 1996.
96. **Kramer K, Cheung N K V, DiResta G, et al:** Pharmacokinetics and acute toxicology of intraventricular I-monoclonal antibody targeting disialoganglioside in non-human primates. *J Neuro Oncol* 1996.
97. **Dropcho E J, Saleh M N, Grizzle W E, Oh S J:** Peripheral neuropathy following treatment of melanoma with a murine anti-GD2 monoclonal antibody (MoAb). *Neurology* 1992 (abstract in press).
98. **Saleh M N, Khazaeli M B, Wheeler R H, et al:** A phase I trial of the murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a in metastatic melanoma. *Cancer Res* 52:4342-4347, 1992.
99. **Saleh M N, Wheeler R H, Khazaeli M B, et al:** A phase I trial of chimeric anti-GD2 monoclonal antibody C14.18 in patients with metastatic melanoma. *International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for cancer* 1991 (abstract).
100. **Cheung N K, Cheung I Y, Canete A, et al:** Antibody response to murine anti-GD2 monoclonal antibodies: Correlation with patient survival. *Cancer Res* 54:2228-2233, 1994.
101. **Drengler R L, Kuhn J G, Schaaf L J, et al:** Phase I and pharmacokinetic trial of oral irinotecan administered daily for 5 days every 3 weeks in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 17:685-696, 1999.
102. **Cheung N K, Landmeier B, Neely J, et al:** Complete tumor ablation with iodine 131-radiolabeled disialoganglioside GD2 specific monoclonal antibody against human neuroblastoma xenografted in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 77:739-745, 1986.
103. **Cheung I Y, Cheung N K V, Kushner B H:** Induction of Ab3' following anti-GD2 monoclonal antibody 3 F8 therapy predicts survival among patients (pts) with advanced neuroblastoma. *Proc Am Assoc Cancer Res* 40:574, 1999.
104. **Chen S, Caragine T, Cheung N K, Tomlinson S:** Surface antigen expression and complement susceptibility of differentiated neuroblastoma clones. *Am J Pathol In press*, 1999.
105. **Cheung N K, Canete A, Cheung I Y, et al:** Disialoganglioside GD2 anti-idiotypic monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 54:499-505, 1993.
106. **Loh A, Sgouros G, O'Donoghue J A, et al:** A pharmacokinetic model of 131I-G250 antibody in patients with renal cell carcinoma. *J Nucl Med* 3:484-489, 1998.
107. **Kolbert K S, Sgouros G, Scott A M, et al:** Implementation and evaluation of patient-specific three dimensional internal dosimetry. *J Nucl Med* 38:301-308, 1997.
108. **Sgouros G, Jureidini I M, Scott A M, et al:** Bone marrow dosimetry: Regional variability of marrow-localizing antibody. *J Nucl Med* 37:695-698, 1996.
109. **Sgouros G, Divgi C R, Scott A M, et al:** Hematologic toxicity in radioimmunotherapy: An evaluation of different predictive measures. *J Nucl Med* 37:43P-44P, 1996.
110. **Sgouros G, Deland D, Loh A C, et al:** Marrow and whole-body absorbed dose vs marrow toxicity following 131IG250 antibody therapy in patients with renal-cell carcinoma. *J Nucl Med* 38:252P, 1997.
111. **Sgouros G:** Treatment planning for internal emitter therapy: methods, applications and clinical implications. 1996.

112. **Furhang E E, Sgouros G, Chui C S**: Radionuclide photon dose kernels for internal emitter dosimetry. *Medical Physics* 23:759-764, 1996.
113. **Furhang E E, Chui C S, Sgouros G**: A monte carlo approach to patient-specific dosimetry. *Medical Physics* 23:1523-1529, 1996.
114. **Furhang E E, Chui C S, Kolbert K S, et al**: Implementation of a monte carlo dosimetry method for patient-specific internal emitter therapy. *Medical Physics* 24:1163-1172, 1997.
115. **Sgouros G**: Yttrium-90 biodistribution by yttrium-87 imaging: a feasibility analysis. *Medical Physics* 2000.
116. **Siegel J A, Wessels B W, Watson E E, et al**: Bone marrow dosimetry and toxicity in radioimmunotherapy. *Antibody Immunoconjugates Radiopharmaceuticals* 3:213-233, 1990.
117. **Scott A M, Macapinlac H, Zhang J, et al**: Image registration of SPECT and CT images using an external fiducial band and three-dimensional surface fitting in metastatic thyroid cancer. *J Nucl Med* 36:100-103, 1995.
118. **Woods R P, Mazziotta J C, Cherry S R**: Quantification of brain function. *Tracer kinetics and image analysis in brain PET*. 1993 (ED. Uemura K, Elsevier Science Publishers).
119. **Talairach J, Tournoux P**: Co-planar stereotactic atlas of the human brain. *Georg Thieme Verlag* 1988.
120. **Meyer C R, Boes J L, Kim B, et al**: Demonstration of accuracy and clinical versatility of mutual information for automatic multimodality image fusion using affine and thin-plate spline warped geometric deformations. *Medical Image Analysis* 1:195-206, 1997.
121. **Sgouros G, Chiu S, Pentlow K S, et al**: Three-dimensional dosimetry for radioimmunotherapy treatment planning. *J Nucl Med* 34:1595-1601, 1993.

30 Tercera serie de experimentos

Purgado inmunomagnético de sarcoma de Ewing de sangre: determinación cuantitativa por PCR en tiempo real

El sarcoma de Ewing es un tumor de la infancia caracterizado por una t(11;22) en la mayoría de los pacientes. Debido a que la supervivencia sigue siendo inferior a la óptima con terapia convencional, muchos pacientes reciben trasplante autólogo de citoblastos y están en proceso ensayos que investigan la transferencia adoptiva de linfocitos T autólogos en el contexto de la inmunoterapia. Sin embargo, aproximadamente el 50% de los pacientes con enfermedad avanzada tienen enfermedad detectable por PCR en sangre periférica y/o médula ósea y la administración de preparaciones autólogas de células contaminadas puede contribuir a una recaída de la enfermedad. Hasta la fecha no se ha informado de ningún procedimiento para purgar poblaciones de células hematopoyéticas contaminadas de sarcoma de Ewing. 8H9 es un anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón previamente informado por reaccionar con 21/21 tumores de sarcoma de Ewing/PNET (Proc ASCO 17:44a, 1998). Las poblaciones de linfocitos T y linfocitos B de sangre periférica y células CD34+ de médula ósea analizadas por citometría de flujo para la unión de 8H9 fueron negativas. Los inventores buscaron usar inmunoselección con perlas magnéticas de células marcadas con 8H9 para purgar poblaciones de células de sangre periférica contaminadas con sarcoma de Ewing. Usando PCR anidada cuantitativa en tiempo real con Lightcycler, los inventores monitorizaron la eficiencia de purgado mediante la evaluación de t(11;22) por RT-PCR. Los especímenes contaminados se marcaron con 8H9 y se incubaron con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo de rata dirigido contra IgG1 de ratón. Entonces, la muestra se vertió en una columna de selección negativa Miltenyi Variomax. La recuperación fue aproximadamente el 70%. Se extrajo ARN de 10e7 células de poblaciones de células antes y después de la purga. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con un nivel de sensibilidad por una célula tumoral en 10e5 células normales. Los inventores demostraron al menos una reducción de dos logaritmos de tumor en preparaciones contaminadas a una relación de 1:10 de PBMC normal y 1:10e3 de PBMC normal. Están en proceso otros estudios que evalúan la eficacia en muestras clínicas. Estos resultados demuestran una posible nueva solución para purgar muestras de pacientes contaminadas para usarse en el contexto de trasplante autólogo de médula ósea y/o ensayos de inmunoterapia para sarcoma de Ewing.

Purgado inmunomagnético de sarcoma de Ewing de sangre y médula ósea: determinación cuantitativa por PCR en tiempo real

La propensión a la diseminación hematogena de sarcoma de Ewing y la contaminación resultante de preparaciones de células autólogas complica el uso de terapias celulares en esta enfermedad. Hasta la fecha no se ha informado de ningún procedimiento para purgar médula y otros productos celulares de sarcoma de Ewing. En este documento, los inventores introducen el anticuerpo monoclonal 8H9, que mostró unión por citometría de flujo a 9/9 líneas celulares de sarcoma de Ewing estudiadas. La unión a linfocitos y células progenitoras de médula ósea fue negativa. Con el fin de probar si 8H9 podría usarse para purgado inmunomagnético, PBMC normales o células de médula ósea se contaminaron artificialmente con cantidades variables de sarcoma de Ewing. La PCR cuantitativa o t(11;22) mostró que medía exactamente el nivel de contaminación con una sensibilidad de 1:10⁶. Entonces, las muestras se purgaron usando el sistema de selección negativo Miltenyi Variomax que seleccionaba células unidas a anticuerpo monoclonal

8H9. Se observó coherentemente una reducción de 2 a 3 logaritmos en la carga tumoral tras la selección inmunomagnética. En la aféresis no movilizada clínica estudiada, la contaminación de Ewing osciló entre $1:10^5$ - $1:10^6$. Por tanto, se predice que el purgado basado en 8H9 de muestras clínicas produce un nivel de contaminación que está por debajo del límite de detección por PCR cuantitativa sensible. Estos resultados demuestran una posible nueva solución para purgar muestras de pacientes contaminadas que van a usarse en el contexto de trasplante autólogo de médula ósea y/o ensayos de inmunoterapia para sarcoma de Ewing. (Mmerino@pol.net).

Los conceptos actuales mantienen que el sarcoma de Ewing es una enfermedad sistémica desde el momento de la aparición como se demuestra por la observación de que más del 90% de los pacientes con enfermedad clínicamente localizada recidivarán vagamente si se tratan con medidas locales solas [Jaffe, 1976 n° 49]. De hecho, el factor generalmente responsable aceptado de la reciente mejora en la supervivencia observada en pacientes con enfermedad clínicamente localizada es el control de micrometástasis hematógicamente diseminadas mediante quimioterapia con multiagentes neoadyuvantes¹. Recientemente, el uso de monitorización molecular sensible para detectar células de sarcoma de Ewing en circulación ha confirmado la diseminación hematógena en un número sustancial de pacientes con sarcoma de Ewing. West y col.² encontraron una incidencia del 25% de positividad de translocalización (11;22) en la sangre periférica o médula ósea en pacientes con enfermedad clínicamente localizada, y se han observado tasas mayores en otras series³ y en pacientes con enfermedad metastásica manifiesta^{3,4}. Interesantemente, en los informes de de Alava y Toretsky, los indicios de positividad en sangre periférica persistieron tras la iniciación de quimioterapia, sugiriendo que la diseminación en marcha puede ser producida intermitentemente por los protocolos de tratamiento.

En un intento por mejorar la supervivencia en pacientes de alto riesgo con sarcoma de Ewing, varios grupos han estudiado el uso de quimioterapia de alta dosis seguida de trasplante de médula ósea o de citoblastos periféricos⁵⁻¹⁷. Se ha informado de hasta un 40% de supervivencia en pacientes de riesgo elevado después de terapia de alta dosis seguida de citoblastos autólogos a diferencia de las tasas de supervivencia históricas del 0-20% con quimioterapia/radioterapia sola^{5,6}. Un factor que complica el uso de productos de citoblastos autólogos en terapia de sarcoma de Ewing es la propensión a diseminación hematógena con contaminación resultante de productos de citoblastos. En un informe, a pesar de la selección positiva basada en CD34 de células progenitoras, se mostró que las preparaciones progenitoras de sangre periférica autóloga contenían células positivas de translocalización EWS/FL11 en el 54% de las muestras evaluadas⁴. Mientras que el impacto clínico verdadero de células tumorales contaminantes en productos autólogos sigue siendo confuso, se ha mostrado que células tumorales genéticamente marcadas que residen en médula ósea autóloga están presentes en la recaída de enfermedad en pacientes con neuroblastoma y AML^{18,19}. Preocupación similar referente a las posibilidades de preparaciones de células autólogas a contribuir a la reaparición de enfermedad se produce en el contexto de ensayos de inmunoterapia que actualmente están siendo realizados e implican la transferencia de linfocitos T autólogos recogidos antes del inicio de la terapia²⁰.

Hasta la fecha no se ha informado de ningún procedimiento para purgar células hematopoyéticas autólogas de sarcoma de Ewing. En este informe, los inventores introducen una técnica de purgado basada en anticuerpos monoclonales que permite reducir dos a tres logaritmos la carga tumoral en muestras de médula ósea o sangre periférica contaminadas, que se predice que está por debajo del límite de detección de positividad por PCR en la gran mayoría de especímenes clínicamente contaminados.

Materiales y procedimientos

Producción de anticuerpos monoclonales (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)

Preparaciones de células

Células mononucleares de sangre periférica: Se obtuvieron PBMC usadas en experimentos de enriquecimiento de tumores por separación con gradiente de densidad basado en Ficoll de la fracción de capa leucocítica fresca de unidades de sangre de donantes sanos normales obtenidas en el Department of Transfusion Medicine, Clinical Center, NCI, según protocolos autorizados. Para el análisis de reactividad de linfocitos T con anticuerpo monoclonal dirigido contra CD3 tras el purgado, las PBMC se enriquecieron en linfocitos T usando una columna de selección negativa (R & D Biosystems, Mineápolis) que produce una pureza de aproximadamente el 80%. Las muestras de aféresis de pacientes analizadas para la contaminación se obtuvieron como parte de NCI POB 97-0052 tras el consentimiento informado. Se hicieron procedimientos de leucaféresis usando CS3000 Plus (Fenwal Division, Baxter, Deerfield, IL) que procesó 5-15 litros de volumen de sangre. La elutriación centrífuga en contracorriente del producto de aféresis se realizó usando una centrífuga Beckman J-6M equipada con un rotor JE 5.0 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) en HBSS sin magnesio, calcio y rojo de fenol (BioWhittaker, Walkersville, MD) a una velocidad centrífuga de 3000 rpm ($1725 \times g$)²¹. Las fracciones de células (450-550 ml cada una) se recogieron a velocidades de flujo de 120, 140 y 190 ml/min durante la centrifugación y a 190 ml/min con el rotor apagado (RO). Las dos primeras fracciones están normalmente enriquecidas en linfocitos, mientras que las dos últimas fracciones están enriquecidas en monocitos. Todas las fracciones se crioconservaron en DMSO al 10% (Cryoserv, Research Industries, Salt Lake City, UT), RPMI con penicilina, estreptomycin y L-glutamina y suero bovino fetal al 25%.

Células progenitoras: Se seleccionaron células CD34+ usadas para experimentos de purgado usando el sistema de aislamiento directo Miltenyi Variomax[®] (Miltenyi, Auburn, CA) a partir de citoblastos periféricos crioconservados de un paciente con sarcoma de Ewing obtenido para uso terapéutico en el Children's National Medical Center, Washington, DC, según protocolos autorizados y tras el consentimiento informado. Se usaron citoblastos para fines

de investigación después de la muerte del paciente. Estas células no fueron positivas por RT-PCR para sarcoma de Ewing y, por tanto, se contaminaron artificialmente para los experimentos de purgado. Se obtuvieron médula ósea seleccionada por no CD34 usada para experimentos de purgado y poblaciones de CD34+ enriquecidas usadas en el ensayo de UFC a partir de médula humana fresca recogida de voluntarios humanos según protocolos autorizados y tras el consentimiento informado (Poietics Laboratories, Gaithersburg, MD). La fracción mononuclear se obtuvo por separación con gradiente de densidad basado en Ficoll y posteriormente se enriqueció en células CD34+ por el sistema de selección de CD34 directo Miltenyi Variomax® (Miltenyi, Auburn, CA).

Líneas celulares tumorales: Se usaron líneas celulares de sarcoma de Ewing para el cribado incluidas TC71, 5838, RD-ES, CHP100, A4573 que han sido previamente informadas²² y JR y SB que son líneas celulares derivadas de pacientes tratados en el National Cancer Institute que también han sido previamente informadas²². LG era una línea celular derivada de un paciente con reaparición intrarrenal aislada de sarcoma de Ewing tratado con resección en la Universidad de Mariland.

Análisis de citometría de flujo

El análisis de citometría de flujo se realizó usando la máquina Becton-Dickinson FACSCalibur. Brevemente, se recogieron datos de fluorescencia usando una amplificación logarítmica de 3 décadas en 10.000 células seleccionadas viables como se determina por la intensidad de dispersión de la luz hacia adelante y lateral. Los anticuerpos monoclonales usados para inmunofluorescencia fueron: MoAb 8H9, isotipo IgG1 murino, anticuerpo de cabra dirigido contra IgG1 de ratón-FITC, CD3 - PE (S4.1), CD34 - PE (581) Caltag (Burlingame, CA), CD99-FITC (TU12) (Pharmingen, San Diego, CA). Para el análisis de inmunofluorescencia, las células se incubaron con anticuerpo a una concentración de 1 ug/10⁶ células durante 20 minutos a 4°, seguido de lavado con PBS con albúmina de suero humano al 0,2% y azida de sodio al 0,1%. Para 8H9 y la tinción de isotipo, esto fue seguido de incubación con FITC de cabra dirigido contra IgG de ratón durante 10 minutos a 4°C seguido de lavado antes del análisis.

Purgado inmunomagnético

Todos los productos celulares se enriquecieron con células tumorales de la línea celular del sarcoma de Ewing TC71 a los niveles de contaminación indicados para experimentos individuales. Para el purgado de citoblastos periféricos CD34+ se concentró un total de 10 x 10⁶. Se analizaron 1 x 10⁶ células por PCR prepurgada y pospurgada. Para PBMC y especímenes de médula ósea seleccionados con no CD34, 30-80 x 10⁶ células se enriquecieron con TC71 con 10 x 10⁶ células analizadas por PCR prepurgada y pospurgada. Para el purgado, las células se incubaron a 4°C con anticuerpo monoclonal 8H9 a una concentración de 1 ug/10⁶ células totales durante 20 minutos y se lavaron con tampón (PBS, BSA al 0,5%, EDTA 2 mM). Entonces, las células se incubaron con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo de rata dirigido contra IgG1 de ratón (Miltenyi, Auburn, CA) a una relación de 1:1 durante 20 minutos a 4°C. El purgado se llevó a cabo usando el sistema Miltenyi Variomax® en el que la muestra se vierte en la columna de agotamiento AS de Miltenyi (Auburn, CA) con una resistencia de flujo de 24G. Entonces, las células de la fracción agotada se lavaron con 3 cc de tampón. Se eliminaron las fracciones de células positivamente seleccionadas liberando la columna del imán y lavando con 3 cc de tampón, y se analizaron por PCR cuando se indicó. En casos en los que se evaluó la clonogenicidad de la fracción positiva, la fracción positiva se sedimentó y se resuspendió en RPMI con SBF al 10%, L-glutamina (4 uM), penicilina (100 u/ml) y estreptomycin (100 ug/ml) y se colocó en un incubador a 37°C con 5% de CO₂ durante 5 días.

PCR convencional

Para el análisis de la contaminación de fracciones de aféresis de pacientes se extrajo ARN de 20-50 x 10⁶ células usando el reactivo TRIzol (Life Technologies, Rockville, MD) o el procedimiento de isotiocianato de guanidinio/CsCl²³. Después de generarse ADNc a partir de 250 ng de ARN usando un hexámero al azar, la PCR se realizó con el sistema de PCR Perkin Elmer GeneAmp 2400 usando los cebadores ESPB1 y ESPB2 y las siguientes condiciones: 40 ciclos 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s seguido de 72°C durante 7 minutos. Para evaluar la integridad y la cantidad de ARN se realizó una reacción de PCR con cebadores de GAPDH para cada muestra de paciente. Se ejecutaron 10 ul de cada producto de PCR en gel de agarosa al 1,3% en TBE y se transfirieron a una membrana de nailon. Se generó una sonda de oligonucleótido 20-mera con [³²P]γ-ATP usando la T4 polinucleótido cinasa. La membrana se hibridó usando la disolución de hibridación ExpressHyb (Clontech, Palo Alto, CA) según las instrucciones del fabricante. Entonces, la membrana se expuso a película Kodak Xomat (Kodak, Rochester, NY) durante 24-144 horas.

PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando el instrumento Lightcycler® (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). El ARN se extrajo de 10 x 10⁶ células de todas las muestras, excepto de la población de CD34+ en la que se usaron 1 x 10⁶ células. Se usaron columnas de extracción de fenol/cloroformo Trizol® o RNA-easy (Qiagen, Valencia, CA). Se usó el kit 1st Strand Synthesis (Roche, Indianápolis, IN) para generar ADNc a partir de 1 ug de ARN a partir de cada muestra. Entonces, la PCR se ejecutó en 5 ul de ADNc en el instrumento Lightcycler® con los cebadores ESPB1 y ESPB2 durante 40 ciclos. En los casos en los que se realizó la PCR anidada se llevaron a cabo 20 ciclos iniciales de PCR con el par de cebadores ESPB1 - ESPB2 seguido de 40 ciclos adicionales usando 2 ul del producto de la primera reacción usando el par de cebadores EWS 696 - F11 1041. Por PCR convencional, el par de cebadores ESPB1-ESBP2, y EWS 696-FLI 1041, generan fragmentos de 310 pb y 205 pb, respectivamente.

Ambos conjuntos de cebadores están fuera del valor crítico de la translocalización de EWS/FLI1. En la evaluación inicial de la PCR cuantitativa, tanto los productos de PCR con Lightcycler® anidada como no anidada se confirmaron por tamaño usando gel de agarosa al 1% en TAE con bromuro de etidio (datos no mostrados). Se usaron sondas de hibridación que extienden el valor crítico de EWS/FLI1 para detectar el patrón diana en la reacción del Lightcycler.

- 5 Para proporcionar un control positivo y para cuantificar el ARN amplificado total, G6PD se amplificó a partir de 5 ul de ADNc y se analizó usando sondas de hibridación específicas de secuencia G6PDHP1 y G6PDHP2. En todas las sondas de hibridación, la sonda en 5' (HP1) estaba marcada en el extremo 3' con fluoresceína, la sonda en 3' (HP2) estaba marcada en el extremo 5' con Lightcycler Red 640 y fosforilada en el extremo 3'. El número de cruces de ciclos se determinó en el momento en el que todas las muestras habían entrado en la fase lineal logarítmica. El número de cruces de ciclos se usó para determinar el logaritmo de la concentración de células según una curva patrón. La curva patrón se generó amplificando 5 ul de ADNc derivado de 1 ug de ARN de 10×10^6 PBMC normales enriquecidas con células tumorales TC71 a concentraciones decrecientes de 1:10 a $1:10^7$.

Secuencias

15

Sonda de [32 P] γ 5'TACTCTCAGCAGAACACCTATG

20 Cebadores

ESBP1 5' CGA CTA GTT ATG ATC AGA GCA 3'

ESBP2 5' CCG TTG CTC TGT ATT CTT ACT GA 3'

EWS 696 5' AGC AGC TAT GGA CAG CAG 3'

FLI 1 1041 5' TTG AGG CCA GAA TTC ATG TT 3'

25 G6PD1 5' CCG GAT CGA CCA CTA CCT GGG CAA G 3'

G6PD 2 5' GTT CCC CAC GTA CTG GCC CAG GAC CA 3'

Sondas de hibridación en Lightcycler

EWSHP 1 5' TAT AGC CAA CAG AGC AGC AGC TAC - F 3'

30 EWSHP2 5' LC RED 640 - GGC AGC AGA ACC CTT CTT - P 3'

G6PDHP1 5' GTT CCA GAT GGG GCC GAA GAT CCT GTT G - F 3'

G6PDHP2 5' LC RED 640-CAA ATC TCA GCA CCA TGA GGT TCT GCA C-P3'

35 Proliferación mediada por OKT3 de especímenes de linfocitos T purgados

Se contaminaron 1×10^8 células enriquecidas con CD3 con sarcoma de Ewing a un nivel de $1:10^3$. Las células de muestras prepurgadas y pospurgadas se añadieron por triplicado a una placa de 96 pocillos a una concentración de 2×10^5 células/pocillo que contenía concentraciones decrecientes de anticuerpo dirigido contra CD3 unido a la placa OKT3 (Ortho Biotech Inc., Raritan, NJ) de 100 ug/ml a 3 ug/ml. Las células se incubaron con 200 ul de RPMI con SBF al 10%, L-glutamina, penicilina y estreptomycin durante 48 horas y luego se pulsaron con 1 uCi de [3 H]-timidina por pocillo. Las células se recogieron después de 18 horas de pulsación y la incorporación de 3 H se enumeró usando TopCount NXT (Packard, Meriden CT). La resta de la actividad de fondo con medio solo generó recuentos netos.

45 Ensayo de UFC

Se enriquecieron células CD34+ a partir de muestras pre y pospurgadas de médula ósea humana fresca usando el kit de aislamiento directo de progenitoras CD34+ Miltenyi®. Se ejecutaron 35×10^6 células mononucleares de médula ósea a partir de cada muestra sobre una columna de selección positiva (MS) dando una población enriquecida en CD34+ con purezas estimadas de $>70\%$ ²⁴. Se sembraron en placa 1000 células por triplicado en medio de metilcelulosa complementado con citocinas recombinantes (MethoCultGF+H4435, Stem cell Technologies, Vancouver, BC). Las UFC se contaron después de 14 días de cultivo.

Resultados

- 55 *El anticuerpo monoclonal 8H9 se une a todas las líneas celulares de sarcoma de Ewing probadas, pero no a linfocitos normales o progenitores hematopoyéticos*

60 Con el fin de identificar un posible reactivo que pudiera usarse para elegir como diana células de sarcoma de Ewing contaminantes, los anticuerpos monoclonales inducidos mediante inmunización con neuroblastoma se cribaron para reactividad cruzada con sarcoma de Ewing. Se observó que el anticuerpo monoclonal 8H9 se unía a 9/9 líneas celulares de sarcoma de Ewing evaluadas (Figura 1). El nivel de reactividad fue variable con algunas líneas mostrando niveles reducidos de reactividad en comparación con CD99, mientras que dos líneas (SB y RD-ES) mostraron un aumento de la reactividad en comparación con CD99. Y, lo que es más importante, poblaciones linfoides y hematopoyéticas no mostraron reactividad con 8H9 como se muestra en la Figura 2a (PBMC seleccionadas con CD3), y la Figura 2b (células de médula ósea seleccionadas con CD34), mientras que CD99 mostró unión significativa a poblaciones de linfocitos T.

La cuantificación de la contaminación de sarcoma de Ewing usando PCR en tiempo real de especímenes artificialmente contaminados cuantifica con exactitud la contaminación tumoral con sensibilidad a $1:10^6$

Para estudiar si el purgado inmunomagnético de poblaciones de médula y sangre periférica contaminadas con sarcoma de Ewing podría monitorizarse cuantitativamente, los inventores buscaron crear una solución en la que niveles variables de contaminación pudieran cuantificarse usando RT-PCR. Los inventores empezaron contaminando artificialmente poblaciones de PBMC con una valoración logarítmica de contaminación de Ewing (por ejemplo, $1:10 - 1:10^7$). El grado de contaminación se evaluó usando PCR en tiempo real. Usando una PCR no anidada, los inventores observaron relaciones lineales a través de cuatro niveles logarítmicos de contaminación (Figura 3a). Sin embargo, el límite de detección para una PCR no anidada era 1 célula tumoral en 10^4 células de fondo. En un esfuerzo por aumentar la sensibilidad, los inventores también evaluaron PCR anidada usando 20 ciclos iniciales de amplificación seguido de 40 ciclos de amplificación con cebadores internos. Con esta solución, la exactitud cuantitativa se perdió para sólo el mayor nivel de contaminación, que probablemente empezó a estabilizarse con los 20 ciclos iniciales (3b). Sin embargo, la exactitud cuantitativa se observó para niveles de contaminación entre $1:100$ y $1:10^6$ (Figura 3c). Debido a que en estos experimentos se usaron las 10×10^6 células de partida, los inventores pueden estimar que usando la solución anidada la amplificación se llevó a cabo a partir de 10 células contaminantes. Esto confirmó la utilidad de PCR cuantitativa para proporcionar una evaluación cuantitativa exacta de contaminación tumoral con un nivel de sensibilidad de un tumor en 10^6 células de fondo, permitiéndose así mediciones de la eficacia de soluciones basadas en 8H9 para purgar células de sarcoma de Ewing.

El purgado inmunomagnético basado en el MoAb 8H9 produce una reducción de 2 a 3 logaritmos en sangre periférica artificialmente contaminada y poblaciones de médula ósea

Con el fin de purgar poblaciones progenitoras hematopoyéticas de sarcoma de Ewing, poblaciones de citoblastos de médula ósea o sangre periférica incubadas con 8H9 variablemente contaminadas se vertieron en una columna de selección negativa Variomax® como se describe en los procedimientos. La evaluación por PCR no anidada de médula ósea seleccionada con no CD34 de un donante sano enriquecida con células de sarcoma de Ewing a un nivel de $1:100$ se muestra en la Figura 4a. Estos resultados demuestran una reducción de 2 logaritmos en el tumor tras el purgado basado en 8H9. Para evaluar la eficiencia del purgado basado en 8H9 con contaminación progenitora a niveles más bajos y para evaluar la capacidad de purgar células seleccionadas con CD34+, las células seleccionadas con CD34+ de sangre periférica movilizadas en G-LCR se enriquecieron a un nivel de $1:10^3$ y se purgaron como se muestra en la Figura 4b. Usando la PCR cuantitativa, los inventores observaron una reducción de 3 logaritmos en el nivel de contaminación tras un vertido sobre la columna.

En los siguientes experimentos se realizó la evaluación de la capacidad para purgar poblaciones de PBMC contaminadas. Similar a los resultados observados con citoblastos de sangre periférica enriquecida con CD34+, se obtuvo al menos una reducción de 3 logaritmos en la contaminación tras el purgado basado en 8H9 de PBMC contaminadas a $1:100$ como se muestra en la Figura 4c. La evaluación del purgado de PBMC contaminadas a un menor nivel ($1:10^3$) se muestra en la Figura 4d en la que de nuevo se observa una reducción de 3 logaritmos. En cada uno de estos experimentos, el análisis de la fracción positiva demostró positividad por PCR confirmando la selección de células de Ewing contaminantes (datos no mostrados). Para representar cualquier variación de las cantidades uniformes esperadas de ARN o ADNc de partida, la amplificación de G6PD se realizó a partir de cada muestra en un modo cuantitativo. Los inventores observaron una variación en el tiempo de cruce (que refleja el molde de partida) inferior al 2% en todas las muestras que indica un bajo grado de variación en el molde de partida entre muestras y que confirma ARN y ADNc viables en las muestras negativas (datos no mostrados). Estos resultados sugirieron que el anticuerpo monoclonal 8H9 puede ser un candidato adecuado para el purgado inmunomagnético de sangre contaminada, médula ósea y especímenes de poblaciones progenitoras enriquecidas en CD34+, siendo la probabilidad de purgado para negatividad por PCR alta si el nivel de contaminación presente en las muestras clínicas es inferior a $1:10^4$.

La contaminación de fracciones de aféresis de pacientes no movilizadas con sarcoma de Ewing está entre $1:10^5 - 1:10^6$

Con el fin de evaluar el grado de contaminación normalmente observada en especímenes clínicos, los inventores estudiaron especímenes de aféresis de sangre periférica no movilizada derivados de pacientes tratados en ensayos de inmunoterapia para sarcoma de Ewing en la institución de los inventores. Los inventores observaron un 66% (8/12) de incidencia de positividad por PCR de t(11,22) en especímenes de aféresis no movilizadas adquiridos para uso en protocolos de inmunoterapia como se analiza por PCR convencional (Tabla 1). Como se muestra en la Tabla 1, se observó que todas las fracciones de aféresis elutriadas contenían tumor con variabilidad a lo largo de los pacientes individuales. Cuando los especímenes de aféresis elutriados de varios pacientes se analizaron en la presentación de sarcoma de Ewing metastásico usando PCR cuantitativa, este nivel de contaminación se estimó que estaba entre $1:10^5$ y $1:10^6$ con niveles de contaminación similares observados algunas veces en múltiples fracciones de aféresis (Figura 5). El paciente A (panel superior) mostró positividad de todas las fracciones a niveles de aproximadamente $1:10^6$. El paciente B (panel central) mostró un nivel de contaminación de aproximadamente $1:10^6$ en la fracción de 120 ml/min (linfocito) sin indicios de positividad en las fracciones de 190 ml/min o de rotor apagado (monocito). El paciente C (panel inferior) mostró un nivel de contaminación entre $1:10^5$ y $1:10^6$ en múltiples fracciones. En ningún caso los inventores han observado niveles de contaminación superiores a $1:10^4$. Por tanto, debido a que los especímenes clínicos contaminados con sarcoma de Ewing parecen estar en el intervalo de $1:10^5 - 1:10^6$, se prevé que la reducción en la contaminación a al menos $1:10^7$ tras el purgado basado en 8H9 pueda alcanzarse en la gran mayoría de pacientes.

TABLA 1

Contaminación de fracciones de aféresis no movilizadas con sarcoma de Ewing como se analiza por PCR convencional

Número de paciente	Fracciones de linfocitos			Fracciones de monocitos	
	120 ml/min	140 ml/min	190 ml/min	Rotor apagado	
1	N/A	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva
2	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
3	Positiva	Negativa	Positiva	N/A	N/A
4	Negativa	Negativa	N/A	Positiva	Positiva
5	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
6	N/A	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
7	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
8	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
9	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
10	Positiva	Positiva	N/A	Positiva	Positiva
11	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
12	Negativa	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva

Positiva indica banda hibridada con la sonda radiomarcada con EWS/FLI. Negativa indicó que no se observó banda. N/A indicó que no se obtuvo ARN para esa fracción.

El purgado basado en 8H9 no afecta adversamente la función de citoblastos o linfocitos T

Para evaluar adicionalmente la viabilidad clínica de esta técnica para purgar autoinjertos de médula ósea o de PBSC, los inventores buscaron confirmar la capacidad proliferativa y diferenciadora conservada en poblaciones de médula ósea purgadas con 8H9. Los inventores estudiaron la formación de UFC tras el purgado como un ensayo de la función de CD34. Los inventores compararon la formación de UFC antes y después de purgar en células de médula ósea seleccionadas con CD34 cultivadas en medio de metilcelulosa con citocinas recombinantes antes y después del purgado (Figura 6). Los inventores observaron números de colonias y morfología normales en ambas muestras con diferencia no significativa entre muestras que indica que los progenitores de CD34+ siguen siendo funcionales tras el purgado basado en 8H9.

La proliferación de linfocitos T es invariable antes y después del purgado

Debido a que los linfocitos T pueden contribuir a la inmunorreconstitución después de la quimioterapia²⁵, los inventores están utilizando actualmente infusiones de linfocitos T autólogos recogidos antes de iniciar la quimioterapia con el fin de estudiar los efectos sobre la inmunorreconstitución. Con el fin de estudiar la función de linfocitos T tras el purgado basado en 8H9, los inventores evaluaron la proliferación de linfocitos T tras el ligado cruzado dirigido contra CD3 como medida de la función de los linfocitos T. Los inventores compararon la proliferación de linfocitos T de linfocitos T sin manipular y linfocitos T purgados basados en 8H9. Como se muestra en la Figura 7, no hubo diferencia en la proliferación de linfocitos T provocados por anticuerpo OKT3 unido a la placa a concentraciones que oscilan de 100 ug/ml a 3 ug/nl como se mide por la captación de [³H]-timidina, que indica que la capacidad proliferativa de linfocitos T se conserva tras el purgado basado en 8H9 (Figura 7).

Discusión

No se conoce completamente la contribución de preparaciones autólogas contaminadas a la recaída de enfermedad tras SCT autólogo en pacientes con tumor sólido tumor. Rill y Brenner y col. han mostrado que en ciertos tumores sólidos, los tumores que contaminan los injertos autólogos son tumorigénicos y están presentes en la recaída^{18,19}. En una enfermedad tal como sarcoma de Ewing, que se ha mostrado que tiene un alto grado de diseminación hematológica, esto llega a ser un problema importante en el contexto de terapias que utilizan células autólogas. En pacientes de alto riesgo, la supervivencia después de quimioterapia de alta dosis seguida de rescate de citoblastos continúa siendo inferior a la óptima, siendo la causa de muerte más común debida a una recaída de la enfermedad. No puede excluirse que la contaminación de autoinjertos con posterior supervivencia y crecimiento clonogénico del tumor después de la infusión contribuya a este mal pronóstico. Además de las consecuencias médicas de la administración de productos contaminados a pacientes, psicológicamente hay renuencia por parte de los pacientes y sus familias por recibir productos contaminados. Por tanto, de esto resulta que si un procedimiento de purgado estaba disponible, se garantiza su evaluación para uso en pacientes que reciben productos autólogos.

Un procedimiento de purgado ideal sólo debería elegir como diana células tumorales y no mostrar unión a poblaciones de células normales. La identificación de un antígeno específico de tumor tal ha representado históricamente un reto en el sarcoma de Ewing. Mientras que CD99 normalmente muestra alta expresión en células de sarcoma de Ewing, también se expresa en linfocitos T (Figura 2a) y citoblastos CD34²⁶, haciendo que sea inadecuado para pur-

gar productos hematológicos. El anticuerpo monoclonal 8H9 se desarrolló inicialmente debido a su reactividad con neuroblastoma y posteriormente se informó que reaccionaba con 19/19 sarcomas de Ewing frescos/tumores de PNET, confirmando que la reactividad con 8H9 no está limitada a líneas celulares establecidas²⁷. Los resultados de los inventores (Figura 1) confirmaron esta reactividad en todas las líneas celulares de Ewing evaluadas. Como este anticuerpo no mostró reactividad con linfocitos T y células CD34+, era idealmente apto para el purgado. De hecho, los inventores demostraron una reducción de 2-3 logaritmos en todos los experimentos tras un vertido en la columna de selección negativa. En la práctica clínica del trasplante autólogo de citoblastos sería de esperar que la combinación de selección positiva de células CD34+, que produce un agotamiento pasivo de aproximadamente 2 logaritmos de tumor^{28,29}, seguido del purgado con 8H9 de células tumorales, produjera hasta 5 logaritmos de agotamiento, que se predice que está muy por debajo del límite de detección usando técnicas actualmente disponibles. Además, incluso en el contexto de trasplante autólogo de linfocitos T, como posiblemente se usa en el contexto de terapias reconstitutivas inmunitarias²⁰, el uso de purgado basado en 8H9 con su reducción de 2-3 logaritmos disminuirá sustancialmente la carga tumoral contenida en productos celulares autólogos.

Este es el primer informe publicado de 8H9 como anticuerpo monoclonal reactivo con Ewing. Interesantemente, 8H9 también muestra reactividad con varias líneas celulares de rhabdomyosarcoma y osteosarcoma (datos no mostrados). Esto introduce la excitante posibilidad de un anticuerpo específico de sarcoma con posibles aplicaciones en terapia inmunodirigida. Además, la identificación y la caracterización del epítipo específico de tumor que se une a 8H9 podrían ofrecer un importante conocimiento de la biología de estos tumores. Estos estudios están actualmente en proceso. Además, durante el transcurso de los estudios aquí informados, los inventores buscan evaluar en un sentido general la función de células de sarcoma seleccionadas con 8H9. Los inventores observaron que las células de sarcoma de Ewing positivamente seleccionadas usando 8H9 retienen sus propiedades clonogénicas y pueden mantenerse en cultivo celular. Esta propiedad tiene la posibilidad de ayudar en la generación y el estudio de líneas celulares tumorales derivadas de pacientes con sarcomas pediátricos, que es actualmente difícil en estos tumores debido a las limitaciones del tamaño tumoral y la accesibilidad quirúrgica de tumores primarios. Los inventores están actualmente investigando si las células de sarcoma de Ewing derivadas de muestras de aféresis o médula ósea en pacientes con enfermedad metastásica que se seleccionan positivamente y crecen en cultivo podrían proporcionar una fuente fácil de muestras tumorales para otro estudio biológico.

La RT-PCR es una herramienta poderosamente sensible para uso en la monitorización de enfermedad residual mínima ERM³⁰. Sin embargo, sigue siendo confuso si el indicio de pequeñas cantidades de tumor residual por análisis molecular es pronóstico de recaída en tumores sólidos y los datos en la bibliografía son opuestos. De Alava y col. evaluaron la ERM en pacientes con sarcoma de Ewing y mostraron una correlación entre positividad por PCR y recaída de enfermedad. Sin embargo, en este informe, algunos pacientes siguieron siendo positivos por PCR sin recaída de enfermedad³. Usando PCR en tiempo real ahora es posible cuantificar el molde de partida y comparar la cantidad de molde de partida entre muestras obtenidas en diferentes momentos de tiempo. La PCR cuantitativa en tiempo real se ha usado como herramienta para monitorizar ERM en pacientes con leucemia^{31,32} y puede ser útil en la evaluación de respuesta de enfermedad³³ y en la predicción de recaída en pacientes mediante la detección de niveles crecientes de transcrito específico de tumor.

Este es el primer informe del uso de PCR cuantitativa en tiempo real usada para detectar y cuantificar transcrito de sarcoma de Ewing. Es posible que la PCR cuantitativa pueda permitir otra identificación de pacientes con un alto riesgo de recaída mediante la detección de cantidades crecientes de transcritos de Ewing con el tiempo. Sin embargo, debido a que es probable que la contaminación de la sangre periférica por tumores sólidos sea relativamente baja (en el intervalo de $1:10^5$ - $1:10^6$ en esta serie), la sensibilidad de este análisis debe ser muy alta con el fin de permitir la detección de niveles muy bajos de tumor en circulación en pacientes con tumores sólidos. El nivel de sensibilidad de la técnica de los inventores alcanzó 1 célula de sarcoma de Ewing en 10^6 células normales con PCR anidada de 10×10^6 células. Es posible que el nivel de sensibilidad fuera incluso más alto si se evaluaran números de células mayores ya que parece que este procedimiento es capaz de amplificar en manos de los inventores el producto de 10 células contaminantes. El enriquecimiento de tumor usando selección positiva es otro procedimiento para aumentar la sensibilidad de la detección de tumores. El procedimiento de selección inmunomagnética positiva descrito en este documento para el purgado también podría proporcionar una solución adecuada para el enriquecimiento de tumores para monitorizar ERM o incluso en la contribución para hacer el diagnóstico correcto en el momento de la presentación inicial con enfermedad metastásica. De hecho, las células eluidas de la columna fueron positivas por análisis de PCR, que demuestra la viabilidad de esta técnica para el enriquecimiento de tumores que predeciría el aumento de la sensibilidad de la detección por PCR de sarcoma de Ewing contaminante en muestras de pacientes. Una advertencia que debería observarse es que la técnica cuantitativa se basa en la suposición de que el nivel de expresión de t(11;22) es homogéneo entre líneas celulares y muestras de pacientes. Sin embargo, esto puede no ser el caso, y puede conducir a subestimación o sobreestimación del nivel de carga tumoral absoluto cuando se comparan muestras de pacientes con una curva patrón. Tales limitaciones no descartarían la evaluación de cambios en el nivel de positividad por PCR de un paciente individual con el tiempo, pudiendo ser menos probables los cambios sustanciales en el nivel de expresión de t(11;22).

En este informe, los inventores han demostrado una técnica de purgado que reduce la carga tumoral al menos 2-3 logaritmos en productos artificialmente contaminados. Esta solución se prevé para reducir sustancialmente la carga tumoral contenida en productos celulares autólogos que se administran en el contexto de terapias innovadoras para sarcoma de Ewing. La demostración de que los ensayos de UFC en células progenitoras, además de en la proliferación de linfocitos T inducida por CD3, son normales después del purgado no demuestra efectos perjudiciales sobre

la función de células progenitoras y linfocitos normales, haciendo que esto sea una adición posiblemente viable a protocolos autólogos. Los inventores concluyen que el purgado inmunomagnético mediante selección negativa usando MoAb 8H9 garantiza la evaluación en ensayos clínicos para sarcoma de Ewing que implica el uso de productos autólogos.

Referencias

1. **Arndt C A, Crist W M.** Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N Engl J Med.* 1999; 341:342-52.
2. **West D C, Grier H E, Swallow M M, Demetri G D, Granowetter L, Sklar J.** Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *J Clin Oncol.* 1997; 15:583-8.
3. **de Alava E, Lozano M D, Patino A, Sierrasesumaga L, Pardo-Mindan F J.** Ewing family tumors: potential prognostic value of reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of minimal residual disease in peripheral blood samples. *Diagn Mol Pathol.* 1998; 7:152-7.
4. **Toretsky J A, Neckers L, Wexler L H.** Detection of (11;22)(q24;q12) translocation-bearing cells in peripheral blood progenitor cells of patients with Ewing's sarcoma family of tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:385-6.
5. **Burdach S, Jurgens H, Peters C y col.** Myeloablative radiochemotherapy and hematopoietic stem-cell rescue in poor-prognosis Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol.* 1993; 11:1482-8.
6. **Burdach S, Nurnberger W, Laws H J y col.** Myeloablative therapy, stem cell rescue and gene transfer in advanced Ewing tumors. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18 Suppl 1:S67-8.
7. **Chan K W, Petropoulos D, Choroszy M y col.** High-dose sequential chemotherapy and autologous stem cell reinfusion in advanced pediatric solid tumors. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20:1039-43.
8. **Fischmeister G, Zoubek A, Jugovic D y col.** Low incidence of molecular evidence for tumour in PBPC harvests from patients with high risk Ewing tumours. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 24:405-9.
9. **Frohlich B, Ahrens S, Burdach S y col.** [High-dosage chemotherapy in primary metastasized and relapsed Ewing's sarcoma. (EI)CESS]. *Klin Padiatr.* 1999; 211:284-90.
10. **Horowitz M E, Kinsella T J, Wexler L H y col.** Total-body irradiation and autologous bone marrow transplant in the treatment of high-risk Ewing's sarcoma and rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol.* 1993; 11:1911-8.
11. **Ladenstein R, Lasset C, Pinkerton R y col.** Impact of megatherapy in children with high-risk Ewing's tumours in complete remission: a report from the EBMT Solid Tumour Registry [published erratum appears in Bone Marrow Transplant 1996 Sep;18(3):675]. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 15:697-705.
12. **Ladenstein R, Philip T, Gardner H.** Autologous stem cell transplantation for solid tumors in children. *Curr Opin Pediatr.* 1997; 9:55-69.
13. **Laws H J, Burdach S, van Kaick B y col.** Multimodality diagnostics and megatherapy in poor prognosis Ewing's tumor patients. A single-center report. *Strahlenther Onkol.* 1999; 175:488-94.
14. **Pape H, Laws H J, Burdach S y col.** Radiotherapy and high-dose chemotherapy in advanced Ewing's tumors. *Strahlenther Onkol.* 1999; 175:484-7.
15. **Perentesis J, Katsanis E, DeFor T, Neglia J, Ramsay N.** Autologous stem cell transplantation for high-risk pediatric solid tumors. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 24:609-15.
16. **Pession A, Prete A, Locatelli F y col.** Phase I study of high-dose thiotepa with busulfan, etoposide, and autologous stem cell support in children with disseminated solid tumors. *Med Pediatr Oncol.* 1999; 33:450-4.
17. **Stewart D A, Gyonyor E, Paterson A H y col.** High-dose melphalan +/- total body irradiation and autologous hematopoietic stem cell rescue for adult patients with Ewing's sarcoma or peripheral neuroectodermal tumor. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18:315-8.
18. **Rill D R, Santana V M, Roberts W M y col.** Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood.* 1994; 84:380-3.
19. **Brenner M K, Rill D R, Moen R C y col.** Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet.* 1993; 341:85-6.

20. **Mackall C, Long L, Dagher R** y col. Combined Immune Reconstitution/Tumor Vaccination to induce anti-tumor immune responses in the setting of minimal residual neoplastic disease [abstract]. *Blood*. 1999; 94:133a.
21. **Quinones R R, Gutierrez R H, Dinndorf P A** y col. Extended-cycle elutriation to adjust T-cell content in HLA-disparate bone marrow transplantation. *Blood*. 1993; 82:307-17.
22. **Kontny H U, Lehrnbecher T M, Chanock S J, Mackall C L**. Simultaneous expression of Fas and nonfunctional Fas ligand in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*. 1998; 58:5842-9.
23. **Chirgwin J M, Przybyla A E, MacDonald R J, Rutter W J**. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979; 18:5294-9.
24. de **Wynter E A, Coutinho L H, Pei X** y col. Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem Cells*. 1995; 13:524-32.
25. **Mackall C L, Gress R E**. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol Rev*. 1997; 157:61-72.
26. **Dworzak M N, Fritsch G, Buchinger P** y col. Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood. *Blood*. 1994; 83:415-25.
27. **Modak S, Gultekin S, Kramer K** y col. Novel Tumor-Associated Antigen: Broad distribution among neuroectodermal, mesenchymal and epithelial tumors, with restricted distribution in normal tissues. *Abstract: Proceedings at ASCO*. 1998.
28. **Vogel W, Scheduling S, Kanz L, Brugger W**. Clinical applications of CD34(+) peripheral blood progenitor cells (PBPC). *Stem Cells*. 2000; 18:87-92.
29. **Dyson P G, Horvath N, Joshua D** y col. CD34+ selection of autologous peripheral blood stem cells for transplantation following sequential cycles of high-dose therapy and mobilisation in multiple myeloma [In Process Citation]. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 25:1175-84.
30. **Emig M, Saussele S, Witter H** y col. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia*. 1999; 13:1825-32.
31. **Mensink E, van de Locht A, Schattenberg A** y col. Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol*. 1998; 102:768-74.
32. **Pongers-Willems M J, Verhagen O J, Tibbe G J** y col. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*. 1998; 12:2006-14.
33. **Branford S, Hughes T P, Rudzki Z**. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol*. 1999; 107:587-99.

Cuarta serie de experimentos

Disialogangliósido GD2 y antígeno limitado a tumor 8H9 novedoso: posibles dianas para inmunoterapia basada en anticuerpos contra tumor desmoplásico de células redondas pequeñas

El tumor desmoplásico de células redondas pequeñas (DSRCT) es una neoplasia agresiva, frecuentemente erróneamente diagnosticada, de niños y jóvenes adultos. Es sensible a quimioterapia, incluso los pacientes tienen frecuentemente una recaída de la terapia debido a enfermedad microscópica residual en sitios lejanos: peritoneo, hígado, ganglio linfático y pulmón. Las estrategias dirigidas a la enfermedad residual mínima (ERM) pueden ser necesarias para la cura. Los anticuerpos monoclonales selectivos para antígenos asociados a tumores de la superficie celular pueden tener utilidad para el diagnóstico y la terapia de ERM como recientemente se ha demostrado en neuroblastoma de fase avanzada (JCO 16: 3053, 1998). Usando inmunohistoquímica, los inventores estudiaron la expresión de dos antígenos: (1) G_{D2} usando el anticuerpo 3F8 y (2) un novedoso antígeno usando el anticuerpo 8H9, en un panel de 36 DSRCT recientemente congelados. G_{D2} es un disialogangliósido que se expresa ampliamente entre tumores neuroectodérmicos, además de sarcomas adultos. 8H9 reconoce un antígeno de 58 kD de superficie expresado entre tumores neuroectodérmicos, mesenquimatosos y epiteliales con expresión limitada en tejidos normales. 27 de 37 tumores (73%) fueron reactivos con 3F8, y 35 de 37 (95%) con 8H9. Tanto G_{D2} como el antígeno de 58 kD se encontraron en la membrana celular tumoral y en el estroma. En general, la inmunorreactividad fue más fuerte y más homogénea con 8H9 que con 3F8. Estos antígenos son posibles dianas para inmunodiagnóstico y terapia de DSRCT basada en anticuerpos.

El tumor desmoplásico de células redondas pequeñas (DSRCT) es un tumor agresivo mal entendido que afecta a niños y jóvenes adultos. Se caracteriza clínicamente por participación serosal abdominal generalizada, metastatiza el peritoneo, el hígado, los pulmones y los ganglios linfáticos y está asociado a un mal pronóstico (Gerald y col., 1991). Histológicamente está constituido por pequeñas células redondas sin diferenciar rodeadas por un abundante estroma desmoplásico. Inmunohistoquímicamente, la coexpresión de marcadores epiteliales, neurales y de músculo es típica (Ordóñez y col., 1993). El DSRCT está asociado a una translocalización cromosómica específica, t(11;22)(p13;q12). El producto génico fusionado alinea el dominio del extremo NH2 del gen de EWS con el dominio de unión a ADN de los dedos de cinc del gen WT1 y es diagnóstico de DSRCT (Ladanyi y col., 1994). Esta fusión produce la inducción del factor de crecimiento endógeno derivado de plaquetas A que estimula el crecimiento de fibroblastos y puede contribuir a la única fibrosis observada con este tumor (Lee y col., 1997). Otro indicio de la regulación por incremento de factores de crecimiento incluye la expresión informada de IGF-II, receptor de PDGF- α y IL-11 en DSRCT (Froberg y col., 1999).

Aunque se ha demostrado una espectacular respuesta a terapia de multimodalidad agresiva en los pacientes con DSRCT (Kushner y col., 1996), muchos pacientes sufren una recaída con enfermedad local recurrente o metástasis a distancia. Por tanto, las estrategias dirigidas a la erradicación de ERM están garantizadas en el control de pacientes con DSRCT. Los anticuerpos monoclonales selectivos para antígenos asociados a tumores de la superficie celular son posibles candidatos como se demostró recientemente en neuroblastoma, en el que la inmunoelección como diana del diasialogangliósido G_{D2} tiene supervivencia a largo plazo significativamente mejorada en pacientes con enfermedad de fase 4 (Cheung y col., 1998). Pocas de tales dianas asociadas a tumor se han definido para DSRCT. Los inventores describen aquí dos dianas posibles para tal inmunoterapia: G_{D2} elegido como diana por el anticuerpo monoclonal 3F8 y un novedoso antígeno tumoral reconocido por el anticuerpo monoclonal 8H9.

25 *Materiales y procedimientos*

Muestras de tejido tumoral y normal

Se analizaron tumores congelados de 37 pacientes con DSRCT. El diagnóstico se confirmó por evaluación con hematoxilina y eosina de especímenes fijados en parafina.

Anticuerpos monoclonales

El anticuerpo monoclonal IgG₃ murino 3F8 se purificó a partir de ascitis como se ha descrito previamente (Cheung y col., 1985). Usando una técnica similar, ratones BALB/c hembra se hiperinmunizaron con neuroblastoma humano. Los linfocitos derivados de estos ratones se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón SP2/0. Los clones se seleccionaron para la unión específica en ELISA. Se seleccionó el hibridoma de 8H9 que secretaba un anticuerpo monoclonal IgG₁. 8H9 se produjo *in vitro* y se purificó por cromatografía de afinidad en proteína G (Pharmacia, Piscataway, NJ).

Estudios inmunohistoquímicos

Ocho μ m de secciones de tumores congeladas en criostato se fijaron en acetona y se lavaron en PBS. Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron como se ha descrito previamente (Kramer y col. 1996). Las peroxidasas endógenas se bloquearon en H₂O₂ al 0,3% en PBS. Las secciones se incubaron en suero de caballo al 10% (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) después de bloquearse con avidina y biotina. La incubación con 8H9 purificado diluido en PBS a 2 μ g/ml se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. Se usó un mieloma de IgG1 como control (Sigma Chemical, St Louis MO). Las secciones se incubaron con un anticuerpo biotinilado secundario de caballo dirigido contra IgG de ratón (Vector Laboratories, Burlingame, CA), seguido de incubación con el complejo ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se tiñó con el kit de sustrato de peroxidasa Vector VIP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) o de sustrato de peroxidasa DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se usó una contratinción de hematoxilina al 10% durante 2 minutos.

La tinción se clasificó como positiva o negativa y se observó reactividad homogénea o heterogénea.

Resultados

Perfil clínico

De los 37 pacientes estudiados, 32 fueron hombres y cinco mujeres. La edad en el diagnóstico osciló de 13 a 46 años (media de 18 años). Todos recibieron tratamiento con una pauta de multimodalidad agresiva que incluía quimioterapia de dosis intensa.

Inmunorreactividad

Se probaron secciones de tumor de 37 pacientes para la expresión de G_{D2} y el antígeno reconocido por 8H9 por inmunohistoquímica. 27 de 37 (73%) dieron positivo para G_{D2} (Tabla 1). La mayoría de los tumores tenía una fuerte inmunorreactividad (>1+). La inmunorreactividad se observó homogéneamente en la mayoría de los tumores y se localizó en la membrana celular (Figura 1). La intensa tinción del estroma fue marcada en todos los tumores estudiados.

TABLA 1

Inmunorreactividad de 3F8 y 8H9 con DSRCT

Marcador	Nº probado	Reactividad				Nº pos. (%)	Homogénea	Heterogénea
		0	1+	2+	3+			
G _{D2}	36	10	10	12	4	26 (72)	19	7
Antígeno de 8H9	36	2	9	17	8	34 (94)	32	2

35 de 37 (95%) tumores dieron positivo para 8H9. La inmunorreactividad tenía una localización de membrana celular característica y era homogénea en casi todos los tumores (Figura 2). La inmunorreactividad estaba más fuertemente marcada que la de con 3F8. Se observó una tinción del estroma igual de fuerte.

Correlación clinicopatológica

En este grupo de tumores diseminados altamente agresivos no hubo correlación entre el resultado y la expresión de tanto G_{D2} como del antígeno de 8H9 (Tabla 2)

TABLA 2

G_{D2} y antígeno de 8H9: Correlación con el resultado

	Positivo para G _{D2}	Positivo para 8H9
Vencimiento*	10/17	16/17
Supervivientes <18 meses desde el diagnóstico	11/14	13/14
Supervivientes >18 meses desde el diagnóstico	5/5	5/5

* 1 paciente murió de toxicidad relacionada con el tratamiento

Discusión

El espectro clinicopatológico de DSRCT sigue definiéndose adicionalmente ya que la serie inicial se informó en 1991 (Gerald y col., 1991). Se ha informado de la quimiosensibilidad por doxorubicina y la quimioterapia basada en alquilante (Gonzalez-Crussi y col., 1990). También se ha informado de la supervivencia prolongada en respuesta a una pauta de multimodalidad agresiva que incluye quimioterapia de alta dosis, radiación y cirugía (Kushner y col., 1996). Sin embargo, la mayoría de los pacientes sucumben a enfermedad local recurrente o metástasis en el peritoneo, hígado, ganglios linfáticos o pulmón. Las recaídas pueden atribuirse en buena parte al fracaso de la erradicación de ERM. Por tanto, se garantizan estrategias terapéuticas alternativas para elegir como diana ERM. Una estrategia tal podría dirigirse a los factores de crecimiento regulados por incremento, particularmente PDGFA, y a factores relacionados expresados en DSRCT (Froberg y col., 1999). Otra solución es la inmunoterapia de elección de diana que utiliza anticuerpos monoclonales, que no se añade a la toxicidad de la quimioterapia.

El DSRCT se caracteriza por la coexpresión de marcadores epiteliales, mesenquimatosos y neuroectodérmicos. Las recientes publicaciones han definido la representación inmunohistoquímica y molecular de DSRCT (Ordóñez, 1998; Gerald, 1999). Sin embargo, la mayoría de los marcadores identificados no pueden usarse como dianas para inmunoterapia mediada por anticuerpos tanto debido a la reactividad cruzada con tejidos normales como a la inaccesibilidad para los anticuerpos monoclonales debido a la localización en el núcleo o el citoplasma (Tabla 3). La mayoría de los marcadores comúnmente expresados en DSRCT que incluyen desmina, citoqueratina, vimentina, antígeno de la membrana epitelial y enolasa específica de neurona también se expresan ampliamente en tejidos normales. Se ha informado que el antígeno de MIC2 se expresa en el 20-35% de DSRCT. Sin embargo, a diferencia de la familia de tumores de sarcoma de Ewing que tienen localización en la membrana, la inmunorreactividad en DSRCT es principalmente citoplásmica (Gerald y col., 1998). Se ha mostrado que MOC31, un anticuerpo monoclonal que reconoce glicoproteína 2 epitelial (EGP-2), es reactivo con la mayoría de DSRCT probados (Ordóñez, 1998). EGP-2 se expresa

en exceso en tumores epiteliales, pero también está presente en células epiteliales normales (de Leij y col., 1994). Los anticuerpos dirigidos contra la proteína WT1 tienen una fuerte inmunorreactividad nuclear específica con casi todos los DSRCT probados (Gerald y col., 1998)

TABLA 3

Antígenos previamente informados en DSRCT

Antígeno	Localización	Reactividad cruzada
Filamentos intermedios		
Desmina	citoplasma	músculo esquelético, cardíaco y liso
Vimentina	citoplasma	tejidos mesenquimatosos
Queratina	citoplasma	células epiteliales
Antígenos epiteliales		
Antígeno de la membrana epitelial	citoplasma	células epiteliales
Glicoproteína 2 epitelial	citoplasma	células epiteliales
Antígeno de Ber-Ep4	citoplasma	células epiteliales
Antígenos neurales CD57	citoplasma	tejidos neurales
Enolasa específica de neurona	citoplasma	tejidos neurales
MIC-2	citoplasma y membrana celular	ganglios linfáticos, células epiteliales
Proteína WT1	Núcleo	Ninguna
PDGFA	Membrana celular	Células endoteliales
Receptor de PDGF-α	Membrana celular	Células hematopoyéticas, células endoteliales, células hematopoyéticas

La expresión informada de antígenos neuroectodérmicos en DSRCT llevó a los inventores a estudiar estos tumores para la expresión de G_{D2} : un disialogangliósido que se expresa en otros tumores de células redondas azules pequeñas tales como neuroblastoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma y osteosarcoma (Heiner y col., 1987), además de en sarcomas de tejido blando en adultos (Chang y col., 1992). G_{D2} es una diana segura para inmunoterapia basada en ensayos clínicos del anticuerpo dirigido contra G_{D2} 3F8 en pacientes con tejidos de neuroblastoma del sistema nervioso (Cheung y col., 1998). El G_{D2} en suero no interfiere con la biodistribución de anticuerpos específicos y el antígeno no está modulado por la superficie celular tras la unión por anticuerpos. La elección como diana satisfactoria del anticuerpo monoclonal 3F8 por G_{D2} se demostró previamente en neuroblastoma (Yeh y col., 1991) y cáncer de pulmón de células pequeñas (Grant y col., 1996). 3F8 también ha mostrado eficacia en ensayos clínicos en pacientes con neuroblastoma (Cheung y col., 1998b) y melanoma (Cheung y col., 1987). Además, pareció que 3F8 inducía remisiones a largo plazo en pacientes con neuroblastoma de fase 4. Los efectos secundarios informados son vida corta y manejable (Cheung y col., 1998). En el estudio de los inventores, el 72% de DSRCT probados fueron inmunorreactivos con el anticuerpo dirigido contra G_{D2} 3F8. La mayoría de los tumores mostraron una fuerte reactividad homogénea localizada en la membrana celular (Tabla 1) (Figura 1). El DSRCT puede ser un tumor putativo para la elección como diana de anticuerpos *in vivo* con 3F8. Alternativamente puede utilizarse una solución de vacuna antiidiotípica como se ha sugerido para neuroblastoma (Cheung y col., 1994).

El anticuerpo monoclonal 8H9 es una IgG₁ murina derivada de ratones inmunizados con neuroblastoma. Se ha mostrado que tiene una amplia expresión en tumores neuroectodérmicos, mesenquimatosos y epiteliales con expresión limitada en tejidos normales (datos no mostrados). Su perfil inmunorreactivo llevó a los inventores a usarlo para probar DSRCT. El 95% de los tumores dieron positivo con DSRCT. La inmunorreactividad con DSRCT estaba localizada en el estroma y la membrana celular (Figura 2) y para la mayoría de los tumores era intensa y homogénea, y en general, más fuerte que la observada para G_{D2} (Tabla 2).

El antígeno diana para 8H9 parece ser una glicoproteína de 58 kD novedosa con una única distribución en membranas celulares de tumores de linaje variable, pero de expresión limitada en tejidos normales. Esta distribución de tejido hace que sea probable que sea un único antígeno no previamente descrito en DSRCT. La localización de la membrana celular de 8H9 hace que sea elegida como diana por anticuerpos monoclonales. Se ha mostrado que 8H9 conjugado con I¹³¹ radioinmunolocaliza xenoinjertos de neuroblastoma y rhabdomyosarcoma en ratones sin reactividad cruzada significativa con otros órganos (datos no mostrados).

En la terapia de DSRCT, las estrategias para eliminar la enfermedad residual mínima son necesarias para producir curas. La terapia basada en anticuerpo monoclonal puede aumentar la terapia de multimodalidad agresiva eligiendo como diana enfermedad residual mínima sin añadir toxicidad. El estudio de los inventores ha identificado G_{D2} y antígeno de 8H9 como dos marcadores no descritos hasta ahora para DSRCT que pueden ser posibles dianas para diagnóstico diferencial e inmunoterapia.

Referencias

- Chang H. R., Cordon-Cardo C., Houghton A. N., Cheung N. K. y Brennan M. F.**, Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas. *Cancer* 70: 633-8, (1992).
- Cheung N. K., Saarinen, U., Neely, J., Landmeier, B., Donovan D. y Coccia, P.** Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, 45: 2642-2649, (1985).
- Cheung N. K., Lazarus, H., Miraldi F. D., Abramowsky, C. R., Kallick S., Saarinen, U. M., Spitzer, T., Strandjord, S. E., Coccia, P. F. y Berger, N. A.** Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 5: 1430-40, (1987).
- Cheung, N. K., Cheung, I. Y., Canete, A., Yeh, S. J., Kushner, B., Bonilla, M. A., Heller, G. y Larson, S. M.** Antibody response to murine anti GD2 monoclonal antibodies: correlation with patient survival. *Cancer Res.* 54: 2228-33 (1994).
- Cheung N K., Kushner B. H., Yeh S. D. J. y Larson S. M.**, 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage 4 neuroblastoma: a phase II study. *Int. J. Oncol* 12: 1299-306, (1998b).
- Cheung, N. K., Kushner, B. H., Cheung, I. Y., Kramer, K., Canete, A., Gerald, W., Bonilla, M. A., Finn, R., Yeh, S. y Larson, S. M.**, Anti GD2 antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. *J. Clin. Oncol.*, 16: 3053-60, (1998).
- De Leij, L., Helrich, W., Stein, R. y Mattes M. J.** SCLC-cluster-2 antibodies detect the pancarcinoma/epithelial glycoprotein E GP-2 (supplement) *Int. J. Cancer* 8: 60-3, 1994.
- Froberg, K., Brown, R. E., Gaylord, H., Manivel, C.**, Intra-abdominal desmoplastic small round cell tumor: immunohistochemical evidence for up-regulation of autocrine and paracrine growth factors. *Ann Clin Lab Sci* 29: 78-85, 1999.
- Gonzalez-Crussi, F., Crawford, S. E. y Sun, C. J.** Intraabdominal desmoplastic small-cell tumors with divergent differentiation. Observation on three cases of childhood. *Am. J. Surg. Pathol.* 15: 499-513, (1991).
- Grant, S. C., Kostakoglu, L., Kris, M. G., Yeh, S. D., Larson, S. M., Finn, R. D., Oettgen, H. F. y Cheung, N. K.** targeting of small-cell lung cancer using the anti-GD2 ganglioside monoclonal antibody 3F8: a pilot trial. *Eur. J. Nucl. Med.* 23: 145-9 (1996).
- Heiner, J. P., Miraldi, F., Kallick, S., Makley J., Neely, J., Smith-Mensah, W. H. y Cheung N. K.** Localization of GD2-specific monoclonal antibody 3F8 in human osteosarcoma. *Cancer Res.* 47: 5377-81 (1987).
- Kramer, K., Gerald, W., Le Sauteur, L., UriSaragovi, H. y Cheung, N. K.** Prognostic Value of TrkA Protein Detection by Monoclonal Antibody 5C3 in Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* 2: 1361-1367, 1996.
- Kushner, B. H., LaQuaglia M. P., Wollner, N., Meyers, P. A., Lindsley, K. L., Ghavimi, F., Merchant, T. E., Boulad, F., Cheung, N. K., Bonilla, M. A., Crouch, G., Kelleher, J. F., Steinherz, P. G. y Gerald, W. L.**, Desmoplastic small round-cell tumor: prolonged progression-free survival with aggressive multimodality therapy. *J. Clin. Oncol.* 14: 1526-31, (1996).
- Ladanyi, M. y Gerald, W.**, Fusion of the EWS and W T1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. *Cancer Res.* 54: 2837-40, (1994).
- Lee, S. B., Kolquist, K. A., Nichols, K., Englert, C., Maheshwaran, S., Ladanyi, M. y col.**, The EWS-WT1 translocation product induces PDGFA in desmoplastic small round- cell tumour. *Nat Genet* 17, 309-13, 1997.
- Gerald, W. L., Miller, H. K., Battifora, H., Miettinen, M., Silva, E. G. y Rosai, J.**, Intrabdominal desmoplastic small round cell tumor. Report of 19 cases of a distinctive type of high-grade polyphenotypic malignancy affecting young individuals. *Am. L. Surg. Pathol.* 15, 499-513, (1991).
- Gerald, W. L., Ladanyi, M. L., De Alava, E., Cuatrecasas, M., Kushner, B. H., LaQuaglia, M. P. y Rosai, J.** Clinical pathologic, and molecular spectrum of tumors associated with t(11;22)(p13;q12): desmoplastic small round-cell tumor and its variants. *J. Clin. Oncol.*, 16: 3028-36, (1998).
- Ordóñez, N. G., El-Naggar, A. K., Ro, J. Y., Silva, E. G., Mackay B.**, Intra-abdominal desmoplastic small cell tumor: a light microscopic, immunocytochemical, ultrastructural, and flow cytometric study. *Hum. Pathol.* 24, 850-65, (1993).
- Ordóñez, N. G.** Desmoplastic small round cell tumor: II: an ultrastructural and immunohistochemical study with emphasis on new immunohistochemical markers. *Am. J. Surg. Pathol.* 22: 1314-27, (1998).

Yeh S. D., Larson, S. M., Burch, L., Kushner, B. H., LaQuaglia, M, Finn, R. y Cheung, N. K. Radioimmuno-detection of neuroblastoma with iodine-131-3F8: correlation with biopsy, iodine-131-metaiodobenzylguanidine and standard diagnostic modalities. *J. Nucl. Med.* 32: 769-76 (1991).

5 Quinta serie de experimentos

Anticuerpo antiidiotípico como antígeno sustituto para clonar scFv y sus proteínas de fusión

scFv proporciona una unidad de recirculación versátil para las novedosas construcciones de fusión de anticuerpos. Sin embargo, un cribado y ensayo de unión fidedignos es frecuentemente la etapa limitante para antígenos que son difíciles de clonar o purificar. Los inventores demuestran que pueden usarse anticuerpos antiidiotípicos como antígenos sustitutos para clonar scFv y sus proteínas de fusión. 8H9 es un anticuerpo monoclonal IgG1 murino específico para un antígeno novedoso expresado en la superficie celular de un amplio espectro de tumores sólidos humanos, pero no en tejidos normales (Cancer Res 61:4048, 2001). Se produjeron hibridomas de rata antiidiotípicos para 8H9 (clones 2E9, 1E12 y 1F11) por fusión de células somáticas entre linfocitos de rata y mieloma SP2/0 de ratón. En ensayos de unión (ELISA) directos fueron específicos para el idiotipo 8H9. Usando 2E9 como antígeno sustituto, scFv de 8H9 se clonó a partir de ADNc de hibridoma por expresión en fago. Entonces, el scFv de 8H9 se fusionó con ADNc de 1-CH2-CH3 humano para la transducción en células CHO y NSO. Se seleccionaron altos expresores de anticuerpo quimérico de scFv de ratón-Fc humano. El homodímero secretado reaccionó específicamente con células tumorales positivas para antígeno por ELISA y por citometría de flujo, inhibible por el anticuerpo antiidiotípico. El tamaño reducido produjo una semivida más corta *in vivo*, a la vez que se logró la relación de tumor con respecto a no tumor comparable como anticuerpo 8H9 nativo. Sin embargo, no pudieron mediar citotoxicidades mediadas por células dependientes de anticuerpo ni mediadas por complemento *in vitro*.

25 1. Introducción

La capacidad para condensar el sitio de unión por fusión genética de los genes de inmunoglobulina de región variable para formar scFv ha expandido enormemente las posibilidades y el desarrollo de terapias que eligen diana basadas en anticuerpos (Bird y col., 1988; Huston y col., 1988; Winter y Milstein, 1991; George y col., 1994). Usando bibliotecas de expresión en fago, scFv puede clonarse ahora a partir de bibliotecas de ADNc derivadas de roedores, voluntarios inmunizados o pacientes (Burton y Barbas III, 1994; Winter y col., 1994; Cai y Garen, 1995; Raag y Whitlow, 1995). La disponibilidad de ratones transgénicos y transcrómicos hIg permitirá el esquema de inmunización o patógenos no viables o seguros en seres humanos. La construcción del scFv es la primera etapa crítica en la síntesis de diversas proteínas de fusión que incluyen scFv-citocina (Shu y col., 1993), scFv-estreptavidina (Kipriyanov y col., 1995), scFv-enzima (Michael y col., 1996), scFv-toxinas (Wikstrand y col., 1995), scFv biespecífico (diacuerpos) (Alt y col., 1999), scFv quelante biespecífico (DeNardo y col., 1999), scFv-Ig (Shu y col., 1993), scFv tetravalente (Alt y col., 1999; Santos y col., 1999) y linfocitos T que vuelven a elegir como diana scFv (Eshhar y col., 1993). Las construcciones scFv-Ig imitan moléculas de IgG naturales en su homodimerización por la región Fc, además de su capacidad para activar complemento (CMC) y mediar en las citotoxicidades mediadas por células dependientes de anticuerpos (ADCC).

La construcción de scFv requiere una preparación de antígeno fidedigna tanto para inmunopurificar fagos como para ensayos de unión. Frecuentemente llegan a ser una etapa limitante de la velocidad (Lu y Sloan, 1999), particularmente para antígenos que son difíciles de clonar o purificar. Como alternativas se han aplicado satisfactoriamente expresión en fago basada en células (Watters y col., 1997), y los enzimoanálisis de adsorción (ELISA) cuando están optimizados. Sin embargo, ligeras diferencias en la etapa de inmunopurificación pueden determinar el éxito o el fracaso de la expresión en fago (Tur y col., 2001). Por ejemplo, se necesita una reducción en el pH de lavado para que scFv se dirija al gangliósido G_{D2} con el fin de reducir la adherencia no específica de partículas de fago (Tur y col., 2001). Además, el ensayo de unión a fago puede requerir que preparaciones de membrana resistan el vigoroso procedimiento de lavado.

Los anticuerpos antiidiotípicos se usan frecuentemente como miméticos de antígenos de agentes infecciosos y antígenos tumorales (Thanavala y col., 1986; Wagner y col., 1997). Cuando se preparan como MoAb, son sustitutos ideales cuando el antígeno diana no está fácilmente disponible. El comportamiento físico-químico de inmunoglobulinas como antígenos en ensayos de inmunopurificación y de unión es generalmente conocido y puede normalizarse fácilmente. Los inventores describieron recientemente un novedoso antígeno tumoral reactivo con un MoAb murino 8H9 (Modak y col., 2001). Dada su labilidad y glicosilación, este antígeno es difícil de purificar. Aquí, los inventores describen el uso de un anticuerpo antiidiotípico como antígeno sustituto para clonar un scFv derivado de la biblioteca de ADNc de hibridoma de 8H9, y para la selección de construcciones de fusión quiméricas de scFv de ratón-Fc humano.

2. Materiales y procedimientos

2.1 Animales

Se compraron ratones BALB/c de Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME. Se obtuvieron ratas Lou/CN del National Cancer Institute-Frederick Cancer Center (Bethesda, MD) y se mantuvieron en jaulas ventiladas. Los experimentos se llevaron a cabo según un protocolo autorizado por el Institutional Animal Care and Use Committee, y se siguieron las pautas para el uso apropiado y humano de animales en investigación.

2.2 Líneas celulares

Se proporcionaron líneas celulares de neuroblastoma humano LAN-1 del Dr. Robert Seeger (Hospital infantil de Los Ángeles, Los Ángeles, CA), y NMB7 del Dr. Shuen-Kuei Liao (Universidad de McMaster, Ontario, Canadá). Las líneas celulares se cultivaron en suero bovino definido al 10% (Hyclone, Logan, UT) en RPMI con L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 ug/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich), 5% de CO₂ en un incubador humidificado a 37°C. Se prepararon células mononucleares humanas normales a partir de muestras de médula ósea heparinizada por centrifugación a través de un gradiente de separación por densidad en Ficoll-Hypaque. El suero humano AB (Gemini Bioproducts, Woodland, CA) se usó como fuente de complemento humano.

2.3 Anticuerpos monoclonales

Se cultivaron células en RPMI 1640 con suero de ternero recién nacido al 10% (Hyclone, Logan, UT) complementado con glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich). 3F8, un MoAb IgG3 producido en un ratón Balb/c contra neuroblastoma humano, reconoce específicamente el gangliósido G_{D2}. Se compraron proteínas de mieloma de BALB/c MOPC-104E, TEPC-183, MOPC-351, TEPC-15, MOPC-21, UPC-10, MOPC-141, FLOPC-21 y Y5606 de Sigma-Aldrich. Los MoAb R24 (dirigidos contra GD3), V1-R24 y K9 (dirigidos contra GD3) fueron donaciones del Dr. A. Houghton, OKB7 y M195 (dirigidos contra CD33) del Dr. D. Scheinberg, y 10-11 (dirigidos contra GM2) del Dr. P. Livingston del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York; y 528 (EGF-R) del Dr. J. Mendelsohn de MD Anderson, Houston, TX. Se obtuvo 2E6 (anticuerpo de rata dirigido contra IgG3 de ratón) de hibridomas comprados de la Colección americana de cultivos tipo [ATCC] (Rockville, MD). NR-Co-04 fue proporcionado por el Instituto de genética (Cambridge, MA). En el laboratorio de los inventores, 5F9, 8H9, 3A5, 3E7, 1D7, 1A7 se produjeron contra neuroblastoma humano; 2C9, 2E10 y 3E6 contra carcinoma de mama humano y 4B6 contra glioblastoma multiforme. Todos se purificaron por cromatografía de afinidad en proteína A o proteína G (Pharmacia, Piscataway, NJ).

2.4 Anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra 8H9

Se inmunizaron intraperitonealmente (ip) ratas LOU/CN con 8H9 (400 ug por rata) complejo con suero de conejo dirigido contra IgG de rata (en 0,15 ml) y se emulsionaron con un volumen igual (0,15 ml) de adyuvante completo de Freund (CFA) (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). El complejo 8H9-IgG de conejo se preparó mezclando 2 ml (8 mg) de 8H9 purificado con 4 ml de un suero precipitante de conejo dirigido contra IgG de rata de alto título (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Después de la incubación a 4°C durante 3 horas, el precipitado se aisló por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y se resuspendió en PBS. Tres meses después de la inmunización primaria, las ratas se reforzaron ip con el mismo antígeno en CFA. Un mes después se inyectó intravenosamente un refuerzo de 400 ug de complejo de 8H9-anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de ratón. Tres días después, el bazo de rata se extirpó asépticamente y los linfocitos purificados se hibridaron con SP2/0-Ag14 (ATCC). La selección de clones se basó en la unión específica a 8H9 y no al anticuerpo de control 5F9, una IgG1 murina. Se hizo subclonación repetida usando dilución limitante. Los isotipos de los anticuerpos monoclonales de rata se determinaron por el kit de tipado monoclonal (Sigma-Aldrich). Se eligieron clones de anticuerpos antiidiotípicos de rata (2E9, 1E12, 1F11) y se produjeron por el biorreactor miniPERM de alta densidad (Unisyn Technologies, Hopkinton, MA), y se purificaron por cromatografía de afinidad en proteína G (Hitrap G, Pharmacia). La fracción de IgG se eluyó con tampón glicina-HCl a pH 2,7 y se neutralizó con tampón Tris 1 M a pH 9. Después de la diálisis en PBS a 4°C durante 18 horas, el anticuerpo purificado se filtró a través de un filtro Millipore de 0,2 um (Millipore, Bedford, MA) y se guardó congelado a -70°C. La pureza se determinó por electroforesis en SDS-PAGE usando gel de acrilamida al 7,5%.

El ELISA "convencional" para detectar anticuerpos antiidiotípicos de rata (Ab2) fue del siguiente modo: se diluyó 8H9 purificado, o mieloma de IgG1 irrelevante, a 5 ug/ml en PBS y se añadieron 50 ul por pocillo a placas de microtitulación de poli(cloruro de vinilo) (PVC) de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se usaron filas sin antígeno para la resta del fondo. La proteína de carga fue BSA al 0,5% en PBS y se añadió a 100 ul por pocillo, y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Después de lavar se añadieron duplicados de 50 ul de sobrenadante de hibridoma a los pocillos recubiertos con antígeno y se incubaron durante 3 horas a 37°C. Las placas se lavaron y se dejó que un anticuerpo de ratón dirigido contra IgG de rata conjugada con peroxidasa + IgM (Jackson Immunoresearch Laboratory) a 100 ul por pocillo reaccionara durante 1 hora a 4°C. La placa se reveló usando el sustrato o-fenilendiamina (Sigma-Aldrich) (0,5 mg/ml) y peróxido de hidrógeno (0,03%) en tampón citrato 0,1 M-fosfato a pH 5. Después de 30 minutos en la oscuridad, la reacción se inactivó con 30 ul de ácido sulfúrico 5 N y se leyó usando un lector de placas de ELISA.

2.5 Especificidad por ensayo de unión directo

Se recubrieron cincuenta ul por pocillo de anticuerpos monoclonales de ratón purificados o mielomas sobre placas de microtitulación de PVC de 96 pocillos a 5 ug/ml durante 60 minutos a 37°C, se aspiraron y luego se bloquearon con 100 ul de proteína de carga BSA al 0,5% por pocillo. Después de lavar y secar al aire, los pocillos se dejaron reaccionar con anticuerpos antiidiotípicos. El resto del procedimiento fue idéntico al descrito en el ensayo "convencional".

2.6 Especificidad por ensayo de inhibición

Para examinar adicionalmente la especificidad de estos anticuerpos antiidiotípicos se probó la inhibición de la tinción inmunofluorescente de 8H9 de células tumorales por anticuerpos antiidiotípicos. Se preincubaron 8H9 purificado y MoAb dirigido contra G_{D2} 3F8 (todos 10 ug/ml en BSA al 0,5%) con diversas concentraciones de anticuerpos antiidiotípicos durante 30 minutos sobre hielo antes de reaccionar con 10⁶ células de tanto LAN-1 positivo para G_{D2}/positivo para 8H9 (neuroblastoma) o HTB-82 negativo para G_{D2}/positivo para 8H9 (rabdomiosarcoma). Entonces, las células se lavaron dos veces en PBS con azida de sodio al 0,1% y se hicieron reaccionar con anticuerpo de rata dirigido contra IgG de ratón conjugada con FITC (Biosource, Burlingame, CA) sobre hielo durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se lavaron en PBS con azida, se fijaron en paraformaldehído al 1% y se analizaron por FACScan (Becton-Dickinson, CA). Se calculó la fluorescencia media y se calculó la curva de inhibición.

2.7 Construcción del gen scFv

Se aisló ARNm de células de hibridoma de 8H9 usando un kit comercialmente disponible (Quick Prep Micro mRNA Purification, Pharmacia Biotech) siguiendo los procedimientos brevemente explicados por el fabricante. 5 x 10⁶ células de hibridoma cultivadas en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino al 10%, L-glutamina (2 mmol/l), penicilina (100 u/l) y sulfato de estreptomicina (100 ug/ml) se sedimentaron por centrifugación a 800 x g y se lavaron una vez en solución salina tamponada con fosfato libre de RNasa (pH 7,4). Las células recentrifugadas se lisaron directamente en el tampón de extracción. El ARN de poli(A) se purificó por un único fraccionamiento sobre oligo (dT)-celulosa y se eluyó de la oligo (dT)-celulosa en el tampón de elución. La muestra de ARNm se precipitó durante 1 hora con 100 ug de glucógeno, 40 ul de disolución de acetato de potasio 2 M y 1 ml de etanol absoluto a -20°C. El ácido nucleico se recuperó por centrifugación a 10.000 x g durante 30 min. La muestra se evaporó hasta sequedad y se disolvió en 20 ul de agua libre de RNasa.

El gen scFv se construyó por expresión en fago recombinante. Se transcribieron inversamente 5 ul de ARNm en un volumen total de 11 ul de mezcla de reacción y 1 ul de disolución de ditiotreitól (DTT) durante 1 hora a 37°C. Para la amplificación por PCR de regiones variables de inmunoglobulina de 8H9, la mezcla de cebadores de la cadena ligera y el conjunto de cebadores de la cadena pesada (Pharmacia) se añadieron respectivamente para generar cantidades adecuadas de la cadena pesada (340 pb) y ligera (325 pb). Tras un muestreo de 10 min inicial a 95°C se añadieron 5 U de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). El ciclo de PCR estaba constituido por una etapa de desnaturalización de 1 min a 94°C, una etapa de hibridación de 2 min a 55°C y una etapa de extensión de 2 min a 72°C. Después de 30 ciclos de amplificación, el fragmento derivado de PCR se purificó por las perlas Glassmilk (Bio101, Vista, CA) y luego se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE y se detectó por tinción con bromuro de etidio.

Para la unión y la reacción de relleno, tanto fragmentos de cadena pesada como de cadena ligera purificados se añadieron a una mezcla de PCR apropiada que contenía un ligador-cebador de 15 aminoácidos para 8H9, dNTP, tampón de PCR y ADN polimerasa Ampli Taq Gold. Las reacciones de PCR se realizaron a 94°C durante 1 min, seguido de una reacción de hibridación de 4 min a 63°C. Los ADN de cadena pesada y ligera de 8H9 se unieron por el ligador (GGGS)₃ (Pharmacia) en scFv en una orientación VH-VL después de 7 termociclos.

Usando un ADN de scFv ensamblado de 8H9 como molde se llevó a cabo una amplificación por PCR secundaria (30 ciclos de PCR convencional) usando cebadores que contenían sitios de restricción tanto Sfi I como Not I. Por tanto, los sitios de restricción Sfi I y Not I se introdujeron en el extremo 5' de la cadena pesada y el extremo 3' de la cadena ligera, respectivamente. Los ADN de scFv amplificados se purificaron por perlas Glassmilk y se dirigieron con endonucleasas de restricción Sfi I y Not I. El scFv purificado de 8H9 se insertó en el vector pHEN1 (amablemente proporcionado por el Dr. G. Winter, Medical Research Council Centre, Cambridge, UK) que contenía sitios de restricción Sfi I/Nco I y Not I. Las células competentes XL1-Blue de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA) se transformaron con el fagémido pHEN1. El fago auxiliar M13 K07 (Pharmacia) se añadió para rescatar el fagémido recombinante.

2.8 Enriquecimiento de fagémido recombinante por inmunopurificación

Se recubrieron 50 ul de anticuerpo antiidiotípico para 8H9 2E9 (50ug/ml) en PBS sobre las placas de microtitulación de PVC de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se añadieron 100 ul del sobrenadante de la biblioteca de fago a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas. La placa se lavó 10 veces con PBS que contenía BSA al 0,05%. El fago recombinante positivo para antígeno capturado por el MoAb antiidiotípico 2E9 se eluyó con glicina 0,1 M-HCl (pH 2,2 que contenía BSA al 0,1%) y se neutralizó con disolución Tris 2 M. Este procedimiento de inmunopurificación se repitió tres veces. El fagémido 8HpHM9F7-1 se eligió para el resto de los experimentos.

2.9 ELISA

El fago seleccionado se usó para reinfectar células XL1-Blue de *E. coli*. Las colonias se cultivaron en medio 2xYT que contenía ampicilina (100 ug/ml) y glucosa al 1% a 30°C hasta que se obtuvo la densidad óptica de 0,5 unidades a 600 nm. La expresión del anticuerpo scFv se indujo cambiando al medio que contenía IPTG 100 uM (Sigma-Aldrich) e incubando a 30°C durante la noche. El sobrenadante obtenido a partir del medio por centrifugación

se añadió directamente a la placa recubierta con el anticuerpo antiidiotípico 2E9. El sedimento se resuspendió en PBS que contenía EDTA 1 mM y se incubó sobre hielo durante 10 min. El anticuerpo soluble periplásmico se recogió de nuevo por centrifugación y se añadió a la placa. Después de una incubación de 2 horas a 37°C, las placas se lavaron y se añadió anticuerpo dirigido contra MycTag (clon 9E10 de ATCC) durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, el anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón purificado por afinidad (Jackson ImmunoResearch) se dejó reaccionar durante 1 hora a 37°C y las placas se revelaron con el sustrato o-fenilendiamina (Sigma-Aldrich) como se ha descrito previamente.

2.10 Construcción del gen quimérico de ratón-humano scFv-1-CH2-CH3 humano

Se generó un único gen que codifica scFv8H9 por el procedimiento de PCR usando el fagémido 8HpHM9F7-1 como molde. Se llevó a cabo la amplificación por PCR secundaria (30 ciclos de PCR) para insertar la secuencia conductora de IgG1 humana en el extremo 5' del ADN de scFv8H9 más los sitios de restricción en los dos extremos opuestos, es decir, Hind III y Not I, en el extremo 5' del conductor de IgG1 humana y en el extremo 3' de scFv8H9, respectivamente. El ADN de conductor de IgG1 humana-scFv8H9 amplificado se purificó por perlas Glassmilk y se digirió con endonucleasas de restricción Hind III y Not I según instrucciones del fabricante. El fragmento Hind III - Not I de ADNc de conductor de IgG1 humana-scFv8H9 se purificó sobre gel de agarosa y se ligó en el vector pLNCS23 que llevaba el gen 1-CH2-CH3 humano (amablemente proporcionado por el Dr. J. Schlom, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD) (Shu y col., 1993). Las células competentes XL1-Blue de *E. coli* se transformaron con pLNCS23 que contenía el fagémido de scFv. El ADN de scFv-CH2-CH3 se cebó con cebadores apropiados y se secuenció usando el sistema de secuenciación automático de nucleótidos modelo 373 (Applied Biosystems). Las secuencias concordaron con las secuencias de ADNc de las cadenas ligera y pesada de 8H9, además de la 1-CH2-CH3 humana disponible de GenBank que incluía el ASN 297 del dominio CH2. En esta construcción, Cys220 de la bisagra genética se sustituyó por un resto de prolina, mientras que Cys226 y Cys229 se conservaron en la bisagra funcional (Shu y col., 1993).

2.11 Cultivo celular y transfección

Se cultivaron células CHO o células de mieloma NSO (Lonza Biologics PLC, Beshire, UK) en RPMI 1640 (Gibco-BRL) complementado con glutamina, penicilina, estreptomina (Gibco-BRL) y suero bovino fetal al 10% (Gibco-BRL). Usando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen, Valencia, CA), el scFv8H9-1-CH2-CH3 humano recombinante se introdujo mediante pLNCS23 en la célula CHO o células de mieloma NSO. Las células se alimentaron cada 3 días, y se seleccionaron clones resistentes a G418 (1 mg/ml; Gibco-BRL). Después de subclonar mediante dilución limitante, los anticuerpos quiméricos se produjeron por el biorreactor miniPERM de alta densidad de Unisyn Technologies usando ULG al 0,5%-SBF en Hydridoma-SFM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Los anticuerpos quiméricos se purificaron por cromatografía de afinidad en proteína G (Pharmacia).

2.12 SDS-PAGE y análisis de transferencia Western

El sobrenadante, el extracto periplásmico y el extracto celular de los clones positivos se separaron mediante SDS-PAGE reductora y no reductora. Se prepararon gel plano de SDS al 10%-poliacrilamida y tampones según Laemmli (Laemmli, 1970). La electroforesis se realizó a 100 V durante 45 min. Después de completarse la pasada se llevó a cabo transferencia Western como se describe por Towbin (Towbin y col., 1979). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó mediante leche desnatada al 5% en disolución TBS durante 1 hora y se incubó con anticuerpo antiidiotípico para 2E9 durante la noche a 4°C. Después de incubarse con anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de rata conjugada con HRP (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA), la señal se detectó por el sistema ECL (Amersham-Pharmacia Biotech).

2.13 Ensayo de citotoxicidad

Las células tumorales NMB7 o LAN-1 diana se marcaron con Na₂⁵¹CrO₄ (Amersham Pharmacia) a 100 uCi/10⁶ células a 37°C durante 1 hora. Después de lavarse las células, el ⁵¹Cr no excesivamente unido se goteó durante 1 hora a 37°C. Después de lavar adicionalmente se mezclaron 5000 células diana/pocillo con linfocitos hasta un volumen final de 200 µl/pocillo. La citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) se ensayó en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpo quimérico. En citotoxicidad mediada por complemento (CMC) se usó el complemento humano (a dilución final de 1:5, 1:15 y 1:45) en lugar de linfocitos. Las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas. El sobrenadante se recogió usando marcos de recogida (Skatron, Lier, Noruega). El ⁵¹Cr liberado en el sobrenadante se contó en un contador gamma universal (Packard Bioscience, Meriden, CT). El porcentaje de liberación específica se calculó usando la fórmula 100% x (cpm experimentales - cpm del fondo)/(cpm liberables en SDS al 10% - cpm del fondo) en la que cpm son recuentos por minuto de ⁵¹Cr liberado. La liberación total se evaluó por lisis con SDS al 10% (Sigma-Aldrich), y la liberación del fondo se midió en ausencia de células. El fondo fue normalmente < 30% del total para tanto células NMB7 como LAN-1. El anticuerpo 3F8 se usó como control positivo (Cheung y col., 1985).

2.14 Yodación

Se hizo reaccionar MoAb durante 5 min con ¹²⁵I (NEN Life Sciences, Boston, MA) y cloramina T (1 mg/ml en tampón fosfato 0,3 M, pH 7,2) a temperatura ambiente. La reacción se terminó añadiendo metabisulfito de sodio

(1 mg/ml en tampón fosfato 0,3 M, pH 7,2) durante 2 min. El yodo libre se eliminó con resina A1GX8 (BioRad, Richmond, CA) saturada con HSA al 1% (New York Blood Center Inc., Nueva York, NY) en PBS, pH 7,4. Se recogió el pico radiactivo y la radiactividad (mCi/ml) se midió usando un calibrador de radioisótopos (Squibb, Princeton, NJ). Se calcularon la incorporación de yodo y las actividades específicas. La actividad precipitable de ácido tricloroacético (TCA) (Fisher Scientific) fue generalmente >90%.

2.15 Inmunorreactividad *in vitro* de anticuerpo yodado

Se ensayó la inmunorreactividad de anticuerpo marcado con yodo radiactivo usando anticuerpo antiidiotípico purificado 2E9 como antígeno. Se añadieron diluciones apropiadas de anticuerpos marcados con ^{125}I a placas por duplicado y luego se transfirieron a placas de antígeno recientemente preparadas después de 1 h y 4 h de unión a 4°C, respectivamente. La etapa de unión final se dejó avanzar durante la noche a 4°C. La radiactividad en porcentaje total unida fue una suma de 3 momentos de tiempo para cada dilución de anticuerpo. Para 8H9 nativo, la inmunorreactividad máxima fue un promedio de ~ 65%, mientras que el anticuerpo quimérico scFv-Fc de 8H9 fue ~ 48%.

2.16 Estudios en animales

Se compraron ratones sin pelo atímicos (nu/nu) de NCI, Frederick MD. Se xenoinjertaron subcutáneamente con la línea celular de neuroblastoma LAN-1 (2×10^6 células/ratón) suspendida en 100 μl de Matrigel (Becton-Dickinson BioSciences, Bedford, MA) en la ijada. Después de 3 semanas se seleccionaron los ratones que portaban tumores de 1-1,5 cm en la dimensión más larga. Los animales se inyectaron intravenosamente (plexo retro-orbital) con 20 μCi de anticuerpomarcado con ^{125}I . Se anestesiaron con ketamina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, PA) intraperitonealmente y se obtuvieron imágenes a diversos intervalos de tiempo con una gammacámara (ADAC, Milpitas, CA) equipada con colimadores de rejilla. Las muestras seriadas de sangre se recogieron a 5 min, 1, 2, 4, 8, 18, 24, 48, 72, 120 h a partir de ratones inyectados con 10-11 uCi de anticuerpo marcado con ^{125}I . Los grupos de ratones se sacrificaron a 24 h, 48 h y 120 h y se pesaron muestras de sangre (muestreo cardíaco), corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, estómago, suprarrenal, intestino delgado, intestino grueso, columna vertebral, fémur, músculo, piel, cerebro y tumor y se midió la radiactividad mediante un contador gamma. Los resultados se expresaron como porcentaje de dosis inyectada por gramo. Los experimentos en animales se llevaron a cabo según un protocolo aprobado por el IACUC y se siguieron las pautas institucionales para el uso apropiado y humano de animales en investigación.

3. Resultados

3.1 Anticuerpos antiidiotípicos para 8H9

Se seleccionaron hibridomas de rata específicos para 8H9 y no reactivos con IgG1 murina de control. Después de subclonar por dilución limitante, los anticuerpos de rata se produjeron por cultivo en masa en botellas rotatorias y se purificaron por columna de afinidad en proteína G. Por ELISA, 2E9, 1E12 y 1F11, todos de la subclase IgG2a de rata, fueron específicos para 8H9, mientras que fueron no reactivos con un gran panel de anticuerpos monoclonales purificados (Tabla I). A diferencia, los anticuerpos 3C2, 4C2 5C7, 7D6 y 8E12 de las mismas fusiones no fueron específicos para 8H9. El resto de los experimentos en este estudio se llevó a cabo usando anticuerpo 2E9. 2E9 inhibió específicamente la unión de 8H9 a neuroblastoma de LAN-1 (Figura 1A) y rabdomiosarcoma de HTB82 (Figura 1B), mientras que la IgG1 de rata de control (A1G4) no tuvo efecto (Figura 1C).

TABLA I

Anticuerpos antiidiotípicos para 8H9: Especificidad por ELISA

MoAb	Clase	1E12 $\lambda 2a$	1F11 $\lambda 2a$	3C2 $\lambda 2b$	4C2 μ	5C7 μ	7D6 $\lambda 1$	8E12 μ	2E9 $\lambda 2a$
MOPC 315	a	-	-	+++	-	-	-	-	-
20.4	$\lambda 1$	-	-	+++	+++	++	+++	-	-
2C9	$\lambda 1$	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-
2E10	$\lambda 1$	-	-	+++	-	-	+	-	-
3E6	$\lambda 1$	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
3E7	$\lambda 1$	-	-	+++	-	-	+	-	-
4B6	$\lambda 1$	-	-	+++	+++	++	+++	-	-
5F9	$\lambda 1$	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-
8H9	$\lambda 1$	+++	++	+++	+++	++	+++	-	++

MoAb	Clase	1E12 $\lambda 2a$	1F11 $\lambda 2a$	3C2 $\lambda 2b$	4C2 μ	5C7 μ	7D6 $\lambda 1$	8E12 μ	2E9 $\lambda 2a$
MOPC 21	$\lambda 1$	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-
UJ 13A	$\lambda 1$	-	-	+++	++	+	-	-	-
3A5	$\lambda 2a$	-	-	+++	-	-	-	-	-
HOPC-1	$\lambda 2a$	-	-	+++	+	-	-	-	-
3F8	$\lambda 3$	-	-	+++	-	-	-	-	-
FCOPC21	$\lambda 3$	-	-	+++	++	-	++	-	-
NRCO-04	$\lambda 3$	-	-	+++	-	-	-	-	-
R24	$\lambda 3$	-	-	+++	-	-	-	-	-
TIB114	$\lambda 3$	-	-	+++	+	-	++	-	-
Y5606	$\lambda 3$	-	-	+++	-	-	-	-	-
3A7	μ	-	-	+	-	-	-	-	-
3G6	μ	-	-	+++	-	-	-	-	-
5F11	μ	-	-	+	-	-	-	-	-
K9	μ	-	-	+++	-	-	-	-	-
MOPC 104E	μ	-	-	+++	-	-	-	-	-

Nota: DO <0,5 = -, 0,5 ~ 1 = +, 1 ~ 2 = ++, >2 = +++

3.2 Construcción y expresión de scFv de 8H9

Después de tres rondas de inmunopurificación en 2E9, el fago eluido se usó para infectar células HB2151 de *E. coli* y la expresión de scFv se indujo por IPTG. El scFv de la fracción de proteína soluble periplásmica se probó para la unión a 2E9 en ELISA. Tres clones de scFv de 8H9 cuando se compararon con el MoAb 8H9 mostraron títulos similares. El clon 8HpHM9F7-1 se seleccionó para la subclonación. La secuencia de ADN de 8HpHM9F7-1 concordó con aquellas de 8H9VH y 8H9VL, además de la región CH2-CH3 de cadena gamma humana. El sobrenadante, las células solubles periplásmicas y los lisados del sedimento de 8HpHM9F7-1 se separaron mediante SDS-PAGE no reductora y se analizaron por transferencia Western. Se encontró una banda de proteínas con peso molecular de 31 kD en el sobrenadante, los extractos periplásmico y de sedimento celular usando anticuerpo dirigido contra MycTag que reconoció la secuencia GAPVPDPLEPR. Ninguna de tales bandas se detectó en células de control o células 8HpHM9F7-1 sin tratamiento con IPTG.

3.3 Construcción de scFv de ratón-Fc humano quimérico

Los clones quiméricos de CHO y NSO se cribaron por unión a ELISA en 2E9. Se eligieron el clon 1C5 de NSO y el clon 1G1 de CHO para la producción a gran escala. Por SDS-PAGE y por análisis de transferencia Western se encontró una única cadena de 54 kD bajo condiciones reductoras y un homodímero de 102 kD bajo condiciones no reductoras (Figura 2). La especificidad por antígenos se demostró por su unión a células tumorales (Figura 3A, valoración de dosis), y su inhibición por anticuerpo antiidiotípico 2E9 (Figura 3B) en análisis de FACS.

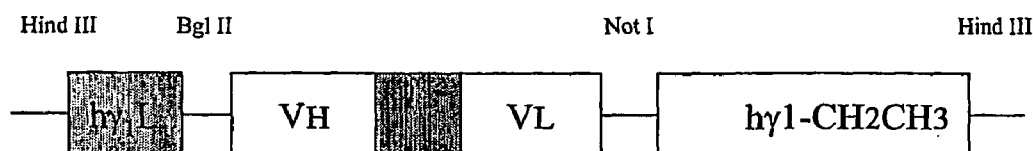
3.4 Propiedades *in vitro* y *in vivo* de scFv-Fc humano

El anticuerpo quimérico scFv-Fc fue ineficaz en la mediación de ADCC en presencia de linfocitos humanos o neutrófilos humanos (17% de citotoxicidad máxima a una relación 50:1 de E:D en comparación con >50% por el MoAb IgG3 murino 3F8). También fue ineficaz en CMC (datos no mostrados). En estudios de biodistribución se localizó bien en xenoinjertos de HTB82 y LAN-1 (Figura 4). Los estudios de eliminación de la sangre mostraron que 8H9 quimérico (MW de 102 kD) tenía T-1/2 de 5,3 h, y T-1/2 de 43 h cuando se comparó con promedios de 4,5 h y 71 h, respectivamente, para 8H9 nativo (MW de 160 kD), un resultado del menor tamaño molecular de la construcción (Figura 5). Similarmente, aunque el porcentaje de dosis inyectada por gramo de la construcción quimérica fue inferior para todos los tejidos (promedio del 44% a 48 h y el 75% a 120 h), las relaciones de tumor-no tumor fueron similares a las de 8H9 nativo (98% a 48 h y 85% a 120 h) (Tabla II).

TABLA II

Porcentaje de dosis inyectada por gramo y relaciones de tumor-no tumor

Órganos	Porcentaje de dosis inyectada/g con respecto al tiempo (h)				
	quimérico			nativo	
	24	48	120	48	120
Piel	1,4	0,7	0,2	1,8	0,7
Corazón	1,3	0,9	0,4	2,6	0,7
Pulmón	2,9	1,9	0,5	4,0	1,1
Hígado	1,2	0,8	0,2	1,4	0,5
Bazo	0,9	0,5	0,2	1,4	0,4
Riñón	1,5	0,9	0,5	1,9	0,5
Suprarrenal	0,9	0,5	0,5	1,8	0,3
Estómago	1,3	0,6	0,3	1,3	0,5
Intestino delgado	0,6	0,3	0,2	0,7	0,2
Intestino grueso	0,6	0,3	0,2	0,6	0,2
Vejiga	1,2	0,6	0,4	1,0	0,6
Músculo	0,5	0,3	0,2	0,5	0,2
Fémur	0,6	0,3	0,2	0,8	0,2
Columna vertebral	0,6	0,4	0,2	0,8	0,3
Tumor	4,0	3,6	2,1	9,4	4,0
Cerebro	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
Sangre	5,3	3,1	1,2	8,3	2,3
Órganos	Relaciones de tumor:no tumor con el tiempo (h)				
	quimérico			nativo	
	24	48	120	48	120
Piel	3,0	6,0	10,7	5,2	7,2
Corazón	3,3	4,0	5,6	3,6	7,7
Pulmón	1,6	2,2	4,5	2,3	5,0
Hígado	3,5	5,2	8,7	6,5	10,1
Bazo	5,1	8,1	12,8	6,7	15,1
Riñón	2,8	4,3	5,9	5,1	8,9
Suprarrenal	4,8	8,7	10,0	5,8	11,6
Estómago	3,6	6,7	13,8	7,5	14,5
Intestino delgado	6,6	11,8	16,0	13,3	21,7
Intestino grueso	7,1	12,7	25,9	15,7	28,5
Vejiga	3,5	14,3	10,2	12,4	12,3
Músculo	7,9	13,6	21,3	18,2	26,8
Fémur	6,7	11,8	20,5	11,8	27,9
Columna vertebral	6,7	6,8	14,2	11,1	19,6
Tumor	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cerebro	22,7	40,9	38,7	44,6	68,2
Sangre	0,8	1,2	1,8	1,1	2,3



4. Discusión

Los inventores demostraron que usando anticuerpo antiidiotípico de rata como sustituto de antígeno pueden producirse convenientemente scFv y proteínas de fusión de scFv. Como prueba del principio, los inventores utilizaron el anticuerpo antiidiotípico para clonar scFv a partir de la biblioteca de ADNc de hibridoma murino. Entonces se usó el anticuerpo antiidiotípico para seleccionar anticuerpos quiméricos scFv-Fc. Tanto scFv como la proteína de fusión scFv-Fc derivada por el procedimiento de los inventores fueron específicos para el antígeno natural, comparable al anticuerpo nativo 8H9. Sin embargo, la proteína de fusión scFv-Fc sólo pudo mediar escasamente en ADCC y en absoluto en CMC.

Mientras que scFv proporciona el bloque de construcción para las proteínas de fusión de scFv, por sí mismo no es el agente de elección de diana ideal. Siendo una proteína pequeña, su eliminación es rápida. Además, es frecuentemente retenido por el riñón, proporcionando efectos secundarios no deseables si la construcción de scFv es citotóxica. Como la afinidad es un parámetro clave en la elección de dianas tumorales *in vivo*, su mayor limitación es su univalencia y frecuentemente la afinidad inferior a la óptima por el antígeno. Se han producido scFv diméricos, triméricos y poliméricos espontáneos usando ligadores VH-VL de longitud decreciente. Sin embargo, estos oligómeros no están unidos por enlace covalente y pueden disociarse *in vivo*. Una solución alternativa es aprovechar el Fc humano, que tiene la capacidad natural de homodimerizarse mediante enlaces disulfuro, permitiendo así la yuxtaposición de dos dominios de unión. También pudieron conseguirse funciones de Fc tales como CMC y ADCC (Shu y col., 1993; Kato y col., 1995; Brocks y col., 1997; Wang y col., 1999; Powers y col., 2001). A diferencia de los anticuerpos quiméricos batenarios estándar, sólo se necesita un polipéptido para el scFv-Fc quimérico; la síntesis sin equilibrar de cadenas pesadas y ligeras no es un problema. También es probable que fragmentos diméricos más grandes tengan semivida en suero aumentada en comparación con scFv y, por tanto, una elección de dianas tumorales mejorada (Adams y col., 1993; Wu y col., 1996). La homodimerización de antígenos de superficie de células tumorales por anticuerpo soluble también puede desencadenar apoptosis de células tumorales (Ghetie y col., 1997). No menos importante es la disponibilidad de técnicas de purificación validadas usando proteína A o proteína G mediante su unión a la porción Fc (Powers y col., 2001). Los scFv tetravalentes (monoespecíficos o biespecíficos) son extensiones naturales de la solución de diacuerpo para la estrategia de fusión scFv-Fc (Alt y col., 1999; Santos y col., 1999) en la que puede conseguirse un aumento significativo en la afinidad. Más recientemente, la proteína de fusión scFv-estreptavidina se ha producido para la terapia de linfoma previamente elegido como diana (Schultz y col., 2000). Aquí, scFv-estreptavidina forma tetrámeros naturales a los que pueden unirse ligandos biotinilados con alta afinidad.

Los anticuerpos antiidiotípicos han facilitado enormemente la selección de clones en la construcción de proteínas de fusión de scFv solubles o scFv de superficie unido a célula. Los inventores han aplicado satisfactoriamente tecnología similar para anticuerpos monoclonales dirigidos contra G_{D2} (Cheung y col., 1993). Siendo inmunoglobulinas, su estructura, estabilidad, bioquímica son generalmente conocidas. A diferencia de los antígenos naturales en los que cada sistema individual tiene sus propiedades únicas y difíciles de predecir. Como antígenos sustitutos, los anticuerpos antiidiotípicos son ideales para la normalización y el control de calidad, especialmente para investigaciones clínicas iniciales en las que no se entiende completamente la naturaleza del antígeno. Existen posibles limitaciones para la solución antiidiotípica. Sólo aquellos anticuerpos antiidiotípicos (Ab2) que reconocen el sitio de unión a antígeno del MoAb de inmunización pueden imitar el antígeno original. Una prueba fidedigna para el Ab2 es su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Alternativamente, la especificidad por antígenos del scFv seleccionado por el anticuerpo antiidiotípico debe ser validada por la unión a células o preparaciones de membrana. Una vez validado, el anticuerpo antiidiotípico puede usarse como sustituto de antígeno para la clonación y el ensayo de otras proteínas de fusión de scFv.

La proteína de fusión scFv-Fc de los inventores carece de actividad de CMC y ADCC. Este hallazgo se diferencia de las proteínas de fusión scFv-Fc previas (Shu y col., 1993; Wang y col., 1999; Powers y col., 2001). Es poco probable que esto sea debido al antígeno p58 reconocido por este scFv, ya que el scFv-Fc dirigido contra G_{D2} hecho con el mismo casete también era deficiente en actividad de CMC y ADCC (datos no mostrados). Una posible explicación puede ser debida a las estructuras de oligosacáridos en la región Fc (Wright y Morrison, 1997). En IgG normal, estos oligosacáridos son generalmente de tipo biantenarico complejo, con bajos niveles de ácido siálico terminal y N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc), siendo esta última crítica para ADCC. La función de ADCC es frecuentemente ineficaz entre anticuerpos quiméricos expresados en líneas celulares que carecen de la enzima (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnIII) (Umana y col., 1999) que cataliza la formación de oligosacáridos bisecantes. Esta enzima puede transfectarse en líneas productoras para aumentar el nivel de GlcNAc bisecante y para aumentar la función de ADCC de anticuerpos quiméricos secretados (Umana y col., 1999). Como los anticuerpos quiméricos de los inventores de tanto los sistemas de expresión de CHO como NSO fueron ineficaces en CMC y ADCC, ambas líneas celulares pueden estar ausentes en la enzima GnIII. También es posible que la ausencia del dominio CH1 en el Fc pueda modificar la accesibilidad del resto ASN297 a glicosiltransferasas en algunas construcciones de scFv-Fc tales como las de los inventores (Wright y Morrison, 1997). Por otra parte, un scFv-Fc que carece de la unión a receptor Fc puede tener menos unión no específica a leucocitos, disminuyendo así la mezcla de sangres en terapia que elige diana. Estos hallazgos pueden tener implicaciones en estrategias de scFv-Fc para mejorar las funciones efectoras.

Referencias

- Adams, G. P., McGartney, J. E., Tai, M.-S., Oppermann, H., Huston, J. S., Stafford, W. F., Bookman, M. A., Fand, I., Houston, L. L. y Weiner, L. W. (1993) Highly specific *in vivo* tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. *Cancer Research* 53, 4026-4034.
- Alt, M., Muller, R. y Kontermann, R. E. (1999) Novel tetravalent and bispecific IgG-like antibody molecules combining single-chain diabodies with the immunoglobulin y1 Fc or CH3 region. *FEBS Letters* 454, 90-94.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. y Whitlow, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.
- Brocks, B., Rode, H. J., Klein, M., Gerlach, E., Dubel, S., Little, M., Pfizenmaier, K. y Moosmayer, D. (1997) A TNF receptor antagonistic scFv, which is not secreted in mammalian cells, is expressed as a soluble mono- and bivalent scFv derivative in insect cells. *Immunotechnology* 3, 173-84.

Burton, D. R. y Barbas III, C. G. (1994) Human antibodies from combinatorial libraries. *Advances in Immunology* 57, 191-280.

Cai, X. y Garen, A. (1995) Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6537-41.

Cheung, N. K., Canete, A., Cheung, I. Y., Ye, J. N. y Liu, C. (1993) Disialoganglioside GD2 anti-idiotypic monoclonal antibodies. *International Journal of Cancer* 54, 499-505.

Cheung, N. K., Saarinen, U., Neely, J., Landmeier, B., Donovan, D. y Coccia, P. (1985) Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Research* 45, 2642-2649.

DeNardo, S. J., DeNardo, G. L., DeNardo, D. G., Xiong, C. Y., Shi, X. B., Winthrop, M. D., Kroger, L. A. y Carter, P. (1999) Antibody phage libraries for the next generation of tumor targeting radioimmunotherapeutics. *Clinical Cancer Research* 5, 3213s-3218s.

Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. y Schindler, D. G. (1993) Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 720-4.

George, A. J. T., Spooner, R. A. y Epenetos, A. A. (1994) Applications of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology. *Immunology Today* 15, 559-561.

Ghetie, M. A., Podar, E. M., Ilgen, A., Gordon, B. E., Uhr, J. W. y Vitetta, E. S. (1997) Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7509-14.

Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E. y Crea, R. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5879-83.

Kato, T., Sato, K., Suzuki, S., Sasakawa, H., Kurokawa, M., Nishioka, K. y Yamamoto, K. (1995) Mammalian expression of single chain variable region fragments dimerized by Fc regions. *Molecular Biology Reports* 21, 141-146.

Kipriyanov, S. M., Bretling, F., Little, M. y Dubel, S. (1995) Single-chain antibody streptavidin fusions: tetrameric bifunctional scFv-complexes with biotin binding activity and enhanced affinity to antigen. *Human Antibodies Hybridomas* 6, 93-101.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-85.

Lu, J. y Sloan, S. R. (1999) An alternating selection strategy for cloning phage display antibodies. *Journal of Immunological Methods* 228, 109-119.

Michael, N. P., Chester, K. A., Melton, R. G., Robson, L., Nicholas, W., Boden, J. A., Pedley, R. B., Begent, R. H., Sherwood, R. F. y Minton, N. P. (1996) *In vitro* and *in vivo* characterisation of a recombinant, carboxypeptidase G2::anti-CEA scFv fusion protein. *Immunotechnology* 2, 47-57.

Modak, S., Kramer, K., Humayun, G., Guo, H. F. y Cheung, N. K. V. (2001) Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors. *Cancer Research* 61, 4048-4054.

Powers, D. B., Amersdorfer, P., Poul, M. A., Nielsen, U. B., Shalaby, R., Adams, G. P., Weiner, L. M. y Marks, J. D. (2001) Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *pinchia pastoris*. *Journal of Immunological Methods* 251, 123-135.

Raag, R. y Whitlow, M. (1995) Single-chain Fvs. *FASEB Journal* 9, 73-80.

Santos, A. D., Kashmiri, S. V., Hand, P. H., Schlom, J. y Padlan, E. A. (1999) Generation and characterization of a single gene-encoded single-chain-tetravalent antitumor antibody. *Clinical Cancer Research* 5, 3118s-3123s.

Schultz, J., Lin, Y., Sanderson, J., Zuo, Y., Stone, D., Mallett, R., Wilbert, S. y Axworthy, D. (2000) A tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy. *Cancer Research* 60, 6663-6669.

- Shu, L., Qi, C. F., Schlom, J. y Kashmiri, S. V. (1993)** Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7995-9.
- Thanavala, Y. M., Brown, S. E., Howard, C. R., Roitt, I. M. y Steward, M. W. (1986)** A surrogate hepatitis B virus antigenic epitope represented by a synthetic peptide and an internal image antiidiotypic antibody. *Journal of Experimental Medicine* 164, 227-236.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4.
- Tur, M. K., Huhn, M., Sasse, S., Engert, A. y Barth, S. (2001)** Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. *Biotechniques* 30, 404-413.
- Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H. y Bailey, J. E. (1999)** Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nature Biotechnology* 17, 176-180.
- Wagner, U., Schlebusch, H., Kohler, S., Schmollig, J., Grunn, U. y Krebs, D. (1997)** Immunological responses to the tumor-associated antigen CA125 in patients with advanced ovarian cancer induced by the murine monoclonal anti-idiotypic vaccine ACA125. *Hybridoma* 16, 33-40.
- Wang, B., Chen, Y. B., Ayalon, O., Bender, J. y Garen, A. (1999)** Human single-chain Fv immunoconjugates targeted to a melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan mediate specific lysis of human melanoma cells by natural killer cells and complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1627-32.
- Watters, J. M., Telleman, P. y Junghans, R. P. (1997)** An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology* 3, 21-9.
- Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N. y Reist, C. J. (1995)** Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Research* 55, 3140-8.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. y Hoogenboom, H. R. (1994)** Making antibodies by phage display technology. *Annual Review of Immunology* 12, 433-55.
- Winter, G. y Milstein, C. (1991)** Man-made antibodies. *Nature* 349, 293-299.
- Wright, A. y Morrison, S. L. (1997)** Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends in Biotechnology* 15, 26-31.
- Wu, A. M., Chen, W., Raubitschek, A., Williams, L. E., Neumaier, M., Fischer, R., Hu, S. Z., Odom-Maryon, T., Wong, J. Y. y Shively, J. E. (1996)** Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 2, 21-36.

Sexta serie de experimentos

- Uso de anticuerpo antiidiotípico para potenciar la transducción génica de inmunorreceptores quiméricos de scFv y la expansión clónica de linfocitos humanos**

Antecedentes: Inmunorreceptores quiméricos (CIR) transducidos en linfocitos se unen al reconocimiento de dianas por anticuerpo monocatenario Fv (scFv) para la activación mediante la señalización de CD28/TCR. El anticuerpo monoclonal murino (MoAb) 8H9 reacciona con un novedoso antígeno ampliamente expresado en tumores sólidos (Cancer Research 61:4048, 2001). Los inventores quieren probar si su MoAb antiidiotípico 2E9 puede optimizar la tecnología de CIR.

Procedimientos: Se usó MoAb antiidiotípico 2E9 de rata (IgG2a) como sustituto de antígeno para la clonación inicial de scFv de 8H9 a partir de la biblioteca de ADNc de hibridoma. Se construyó un CIR que estaba constituido por la secuencia conductora de CD8 humana, scFv de 8H9, CD28 (dominios transmembranario y citoplásmico) y cadena zeta de TCR, se ligó en el vector pMSCVneo y se usó para transfectar la línea de encapsidación GP+envAM12 que portaba una envuelta anfótropa.

Resultados: Tres enriquecimientos por afinidad secuenciales con MoAb 2E9 mejoraron significativamente el porcentaje de clones productores positivos para scFv de 8H9 de superficie y la eficiencia de su sobrenadante en la transducción de la línea celular indicadora K562. A las tres semanas de cultivo *in vitro*, >95% de los linfocitos humanos primarios transducidos fueron positivos para CIR. Con estimulación periódica con 2E9 soluble, estos linfocitos expe-

rimentaron expansión “monoclonal”, alcanzando un aumento de 50-100 veces a los 2 meses. Mediaron eficazmente en la citotoxicidad limitada por no MHC específica de antígeno. Cuando se inyectaron intravenosamente inhibieron el crecimiento tumoral en ratones SCID xenoinjertados con rhabdomyosarcoma.

- 5 *Conclusión:* El anticuerpo antiidiotípico puede proporcionar una herramienta útil, especialmente para carbohidrato o antígenos inestables, para facilitar la clonación de scFv y sus construcciones de fusión de CIR, además de su transducción en linfocitos humanos.

Introducción

10

La terapia con células adoptivas usando linfocitos T selectivos de tumor expandidos *ex vivo* puede efectuar espectaculares remisiones de tumores malignos víricamente inducidos, un procedimiento críticamente dependiente de la frecuencia clónica en la que se requiere una rápida expresión exponencial de linfocitos T citolíticos específicos (CTL). Los linfocitos T proliferan cuando se activan (por ejemplo, dirigidos contra CD3), pero sufren apoptosis a menos que se proporcione una señal coestimuladora (por ejemplo, dirigida contra CD28) (1). Sin embargo, las dianas de tumores humanos carecen frecuentemente de moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD80), o estimulan en exceso receptores inhibidores (por ejemplo, CTL4), de forma que descarrila la ruta de CD28. Además, muchos tumores regulan por disminución las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para escapar de la unión por el receptor de linfocitos T (TCR). Mediante la manipulación genética, los inmunorreceptores quiméricos (CIR) que unen scFv selectivo de tumor con moléculas de transducción de la señal de linfocitos T (por ejemplo, cadena zeta de TCR y CD28) activarán linfocitos tras el reconocimiento del tumor, desencadenando la producción de citocinas y la lisis tumoral (2-7). Los linfocitos T también pueden estar genéticamente manipulados para secretar citocinas citotóxicas (8), toxinas (9) o para metabolizar profármacos (10, 11). Sin embargo, siguen existiendo huecos tecnológicos significativos: (1) la transducción génica en linfocitos humanos es ineficaz, (2) los linfocitos T específicos de antígeno no pueden enriquecerse y expandirse fácilmente, y (3) la óptima activación de linfocitos T puede requerir múltiples señales. Además, aunque los linfocitos T redirigidos por CIR puedan recircular su actividad lítica (12), una señal coestimuladora, tanto mediante la unión a CD28 como 4-1BB, puede ayudar a reducir la muerte apoptótica inducida por activación. Recientemente se describió el CIR con multidominios, en el que el dominio intracelular de CD28 se ligó al extremo 5' de la cadena zeta de TCR y se introdujo en células de Jurkat, con el esperado “matar dos pájaros de un tiro” cuando scFv se une a células tumorales (13). La producción de IL-2 fue 20 veces superior a la de CIR con sólo cadena zeta. No se sabe si este mismo efecto puede lograrse con linfocitos T humanos primarios.

Para monitorizar la expresión génica de scFv puede ser útil el anticuerpo dirigido contra el ligador, aunque su eficiencia depende de la accesibilidad de la porción ligadora de scFv. Aunque también pueden usarse antígenos purificados para monitorizar la expresión de scFv, ciertas clases (carbohidratos complejos o antígenos inestables) pueden ser difíciles de preparar y su química altamente variable. Sin un reactivo normalizado para la purificación por afinidad o enriquecimiento de células productoras de virus, la monitorización y la clasificación de linfocitos transducidos, la tecnología de CIR sigue siendo ineficaz. Recientemente, Eshhar y col. describieron una construcción dicistrónica que estaba constituida por scFv-CD28-(y proteína verde fluorescente (GFP), en la que esta última se usó para monitorizar la transducción génica y para enriquecer líneas productoras (7). Aunque GFP puede validar el procedimiento de transferencia de genes, su inmunogenia añadida y su seguridad en aplicaciones clínicas sigue siendo incierta.

Los anticuerpos antiidiotípicos se usan frecuentemente como imitadores de antígenos para enfermedades infecciosas y cáncer (14, 15). Pueden producirse convenientemente anticuerpos antiidiotípicos de rata de imagen interna contra MoAb de ratón. Como la producción a gran escala de MoAb de calidad clínica es ahora rutina, los anticuerpos antiidiotípicos pueden ser sustitutos ideales, especialmente si el antígeno no está fácilmente disponible. Además, la bioquímica de inmunoglobulinas en selección positiva (inmunopurificación, cromatografía de afinidad, clasificación) y ensayos de unión es muy conocida y es fácil de normalizar. Los inventores describieron recientemente un novedoso reactivo de antígeno tumoral con un MoAb murino 8H9 (16). El antígeno fue difícil de purificar dada su labilidad y glicosilación. Aquí, los inventores demuestran que el MoAb antiidiotípico puede usarse como antígenos sustitutos para clonar CIR en linfocitos, es decir, un CIR de scFv de 8H9, CD28 humano y cadena zeta de TCR humano. El MoAb antiidiotípico permite el rápido enriquecimiento por afinidad de la línea celular productora, monitorizando la expresión de scFv en células y la expansión clónica *in vitro* de linfocitos transducidos. Los linfocitos altamente citotóxicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, pueden producirse en masa. Además de proporcionar un sustituto de antígeno, parece que el MoAb antiidiotípico tiene utilidad para la optimización y el control de calidad de terapias génicas basadas en scFv.

Materiales y procedimientos

Materiales. Se cultivaron células en RPMI 1640 con suero de ternero recién nacido al 10% (Hyclone, Logan, UT) complementado con glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin. Las proteínas del mieloma de BALB/c, MOPC-104E, TEPC-183, MOPC-351, TEPC-15, MOPC-21, UPC-10, MOPC-141, FLOPC-21, Y5606, se compraron de Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO. El MoAb R24, V1-R24 y K9 fueron obsequios del Dr. A. Houghton, OKB7 y M195 del Dr. D. Scheinberg, y 10-11 (dirigido contra GM2) del Dr. P. Livingston del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York; 528 del Dr. J. Mendelsohn (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX). 2E6 (anticuerpo de rata dirigido contra IgG3 de ratón) se obtuvo de hibridomas comprados de ATCC (Rockville, MD). NR-Co-04 se proporcionó por Genetics Institute (Cambridge, MA). LS2D173 (anti-GM2) se proporcionó por el Dr. L. Grauer (Hybritech, CA). Del laboratorio de los inventores, 3F8 era un MoAb IgG3 específico para gangliósido G_{D2} (17); 5F9, 8H9, 3A5, 3E7, 1D7, 1A7 se produjeron contra neuroblastoma humano, 2C9, 2E10 y 3E6 contra carcinoma

ES 2 357 425 T3

de mama humano; 4B6 contra glioblastoma multiforme. Todos se purificaron por cromatografía de afinidad en proteína A o proteína G (Pharmacia, Piscataway, NJ).

MoAb antiidiotípico para 8H9. Se produjeron anticuerpos antiidiotípicos a partir de ratas LOU/CN como se ha descrito previamente (18). Se seleccionaron clones basándose en la unión selectiva a anticuerpo 5F11 y no a otros mielomas. La subclonación repetida se hizo usando dilución limitante hasta que las células se volvieron estables. De entre los tres clones de IgG2a de rata específicos (2E9, 1E12, 1F11), 2E9 se eligió para la producción a gran escala usando el biorreactor miniPERM de alta densidad (Unisyn Technologies, Hopkinton, MA), y se purificó por cromatografía de afinidad en proteína G (Hitrap G, Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). La fracción de IgG se eluyó con tampón glicina-HCl a pH 2,7 y se neutralizó con tampón Tris 1 M a pH 9. Después de la diálisis en PBS a 4°C durante 18 horas, el anticuerpo purificado se filtró a través de un filtro Millipore de 0,2 μ m (Millipore Inc. Bedford MA) y se guardó congelado a -70°C. La pureza se determinó por electroforesis en SDS-PAGE usando gel de acrilamida al 7,5%. Se usó ELISA para detectar anticuerpos antiidiotípicos de rata (Ab2) como se ha descrito previamente (18). Similarmente se produjo MoAb antiidiotípico dirigido contra 5F11 de IgG1 de rata.

Construcción del gen scFv. scFv se construyó a partir de ADNc de hibridoma de 8H9 por expresión en fago recombinante usando un kit de construcción de scFv según instrucciones del fabricante con modificaciones (Amersham-Pharmacia). El ADN de scFv amplificado se purificó por perlas Glassmilk y se digirió con endonucleasas de restricción Sfi I y Not I. El scFv purificado de 8H9 se insertó en el vector pHEN1 (amablemente proporcionado por el Dr. G. Winter, Medical Research Council Centre, Cambridge, UK) que contenía sitios de restricción SfiI/NcoI y Not I. Las células competentes XL 10Blue de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA) se transformaron con el fagémido pHEN1. El fago auxiliar M13 K07 (Pharmacia) se añadió para rescatar el fagémido recombinante. El fagémido 8HpHM9F7-1 se eligió para el resto de los experimentos. El sobrenadante, el extracto periplásmico y el extracto celular de los clones positivos se separaron por SDS-PAGE no reductora y la transferencia Western (19) usando anticuerpo dirigido contra MycTag demostró una banda de 31 kD.

Enriquecimiento de fagémido recombinante por inmunopurificación. Se recubrieron 50 μ l de anticuerpo antiidiotípico para 8H9 2E9 (50 μ g/ml) en PBS sobre las placas de microtitulación de polivinilo de 96 pocillos y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se añadieron 100 μ l del sobrenadante de la biblioteca de fago a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas. La placa se lavó 10 veces con PBS que contenía BSA al 0,05%. El fago recombinante positivo para antígeno capturado por el idiotipo 2E9 se eluyó con HCl 0,1 M (pH 2,2 con glicina sólida y BSA al 0,1%) y se neutralizó con disolución Tris 2 M. Este procedimiento de inmunopurificación se repitió tres veces.

ELISA. El fago seleccionado se usó para reinfectar células XL1-Blue de *E. coli*. Las colonias se cultivaron en medio 2xYT que contenía ampicilina (100 μ g/ml) y glucosa al 1% a 30°C hasta que se obtuvo la densidad óptica a 600 nm de 0,5. La expresión del anticuerpo scFv se indujo por cambio del medio que contenía IPTG 100 μ M (Sigma-Aldrich) e incubando a 30°C durante la noche. El sobrenadante obtenido del medio por centrifugación se añadió directamente a la placa recubierta con idiotipo 2E9. El sedimento se resuspendió en PBS que contenía EDTA 1 mM y se incubó sobre hielo durante 10 min. El anticuerpo soluble periplásmico se recogió de nuevo por centrifugación y se añadió a la placa. Después de incubar 2 horas a 37°C, las placas se lavaron y se añadió anticuerpo dirigido contra MycTag (clon 9E10 de ATCC) para reaccionar durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, el anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón purificado por afinidad (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) se dejó reaccionar durante 1 hora a 37°C y las placas se revelaron con el sustrato o-fenilendiamina (Sigma-Aldrich).

Construcción de sc8H9-hCD28_{TM}-hCD28_{cto}-hTCRzeta-pMSCVneo. Usando las secuencias de genes ensambladas, las amplificaciones por PCR secundarias se realizaron usando cebadores de oligodesoxinucleótidos sintéticos (véase más adelante). Brevemente, una mezcla de reacción de 50 μ l que contenía 200 μ M de cada desoxinucleótido trifosfato, 0,2 μ M de cada cebador, 2 unidades de ADN polimerasa AmpliTag Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 50 ng de ADN mensajero se sometió a una etapa de desnaturalización de 10 min y de activación a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (1 min a 95°C), hibridación (2 min a 55°C) y extensión (2 min a 72°C). Esto se siguió de una extensión final durante 8 min a 72°C. Cada uno de los productos amplificados se purificó con Geneclean Kit (Bio 101, Vista, CA).

Cebadores de oligodesoxinucleótidos sintéticos para la amplificación de ADN

Conductor de hCD8a - scFv - CD28:

355 S Cebador de sentido directo (Hpa I - conductor de CD8a humano) 5' - TTA TTA CGA GTT/AAC ATG GCC TTA CCA GTG ACC - 3';

355 A Cebador de sentido contrario (Xho I - CD28 humano) 5' - CTT GGT C/TCGAG TGT CAG GAG CGA TAG GCT GC - 3';

scFv8H9:

365 S Cebador de sentido directo (Cla I-cadena pesada de 8H9) 5' - TTA TTA CGA AT/CGAT T GCC CAG GTC AAA CTG - 3';

ES 2 357 425 T3

365 A Cebador de sentido contrario (Not I - cadena ligera de 8H9) 5' - CTT GGT G/CGGCCGC CTG TTT CAG CTC CAG - 3';

Cadena zeta de hTCR

379 S Cebador de sentido directo (Bst U I - extremo de CD28 - Xho I - hTCR zeta [dominio citoplásmico]) 5' - CG/C GAC TTA GCA GCC TAT CGC TCC TGg CAC/TCG AGa AGA GTG AAG TTC - 3';

379 A Cebador de sentido contrario (BglII - hTCR z) 5' - CTT GGT A/GA TCT TCA GCG AGG GGG CAG GGC - 3'.

Moldes para la amplificación y construcción de ADN. El único gen que codifica conductor de hCD8a-sc3G6-CD28 se ha descrito previamente (20). Su ADNc se generó por PCR usando Hpa I, el fragmento Xho I del ADNc del conductor de hCD8a-scFv-CD28, y se ligó en el vector pMSCVneo (Clontech, Palo Alto, CA). scFv-8H9 se amplificó a partir del fagémido 8HpHM9F7-1. El gen de scFv de 8H9 cortado se intercambió luego en el casete de conductor de hCD8a-scFv3G6-CD28 de pMSCVneo usando las enzimas de restricción Cla I - Not I. La cadena zeta de TCR humano se amplificó a partir del plásmido pcDNA3.1/VJABLZH (amablemente proporcionado por el Dr. Ira Bergman, Universidad de Pittsburgh, PA) y se ligó en la dirección 3' del gen CD28 usando sitios de restricción Xho I y Bgl II. Usando el procedimiento suministrado por el fabricante (Stratagene), células competentes XL1-Blue de *E. coli* se transformaron con el vector pMSCVneo que contenía el inserto. Todas las construcciones de genes se comprobaron por secuenciación de ADN.

Cultivo celular y transfección. La línea celular de encapsidación anfótropa GP+envAM12 y todas las líneas productoras retrovíricas se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) complementado con glutamina, penicilina, estreptomina (Gibco-BRL) y suero bovino fetal al 10% (Gibco-BRL). Usando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen, Valencia, CA), el retrovirus recombinante se produjo por la transfección del ADN del vector en las células de encapsidación GP+envAM12 (amablemente proporcionadas por Genetix Pharmaceuticals, Cambridge, MA). Las células se alimentaron cada 3 días con G418 (400 ug/ml; Gibco-BRL). Se seleccionaron clones resistentes después de un periodo de 10 días.

Enriquecimiento y clonación de líneas de encapsidación por columna de afinidad. Las líneas productoras retrovíricas se enriquecieron por afinidad usando MicroBeads recubiertas con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de rata MACS en el sistema MiniMACS (Miltenyi, Auburn, CA). En resumen, las líneas de encapsidación transducidas se hicieron reaccionar con anticuerpos antiidiotípicos de rata purificados (10 ug por 10⁶ células de encapsidación) sobre hielo durante 30 minutos, se lavaron y luego se aplicaron a la columna dirigida contra IgG de rata. Las células se eluyeron según instrucciones del fabricante y se recultivaron a 37°C durante 24 horas. Tras la tinción con anticuerpo antiidiotípico 2E9 o 1E12, la inmunofluorescencia se detectó con anticuerpo de ratón dirigido contra IgG de rata conjugada con FITC y se analizó por un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry systems, San José, CA). Se realiza una serie de tres purificaciones por afinidad en la línea productora retrovírica antes de subclonar mediante dilución limitante. El sobrenadante que contenía virus de cada clon se usó para infectar células K562, y la transducción génica se midió por expresión superficial de scFv en K562 usando FACS. Una de las líneas celulares K562 transducidas por scFv se enriqueció adicionalmente por el sistema MACS antes de clonar por dilución limitante.

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC se aislaron por centrifugación en Ficoll (densidad, 1,077 g/ml) durante 30 min a 25°C y se lavaron dos veces con PBS. Se activaron con MoAb solubles dirigidos contra CD3 (1 ug/ml; clon OKT3; PharMingen, San Diego, CA) y dirigidos contra CD28 (1 ug/ml; clon CD28.2; PharMingen) durante 3 días a 37°C. En algunos experimentos se usaron MoAb inmovilizados dirigidos contra CD3 y dirigidos contra CD28, en los que placas de 12 pocillos tratadas con cultivo de no tejido se incubaron con el anticuerpo (1 ug/ml en PBS) a 1 ml/pocillo durante 4 horas a 37°C. Las placas recubiertas se bloquearon con HSA al 1% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron una vez con PBS y luego se usaron para la activación de PBMC. Las PBMC (10⁶/ml) se cultivaron en RPMI 1640 complementado con suero AB humano al 10% (Gemini Bio-Products, Woodland, CA), 2-mercaptoetanol 50 µM, L-glutamina 2 µM y penicilina al 1%-estreptomina (Gibco-BRL) durante un total de 3 días antes de la transfección retrovírica.

Protocolo de transducción retrovírica. Las células diana (por ejemplo, K562 o PBMC cultivadas) se resuspendieron a una concentración de 1-5 x 10⁵ células/ml de sobrenadante recientemente recogido de células productoras retrovíricas que contenían 8-10 ug/ml de bromuro de hexadimetrina (Polybrene, Sigma), se centrifugaron a 1000 x g a temperatura ambiente durante 60 minutos y luego se cultivaron en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos durante la noche. Entonces, el sobrenadante vírico se aspiró y medio IMDM fresco (Gibco) que contenía 100 U/ml de IL2 y se cambió aproximadamente cada 5 días para mantener una cifra de células entre 1-2 x 10⁶ células/ml (21). Después de 2 semanas en cultivo, el anticuerpo antiidiotípico soluble 2E9 se añadió a 3-10 ug/ml a los linfocitos transfectados durante 3 días de cada periodo de cultivo de 2 semanas para garantizar la expresión clónica de los linfocitos transfectados positivos para scFv.

Ensayo de citotoxicidad. Células tumorales NMB-7 y LAN-1 diana de neuroblastoma o HTB-82 de rabdomiosarcoma se marcaron con Na₂⁵¹CrO₄ (Amersham Pharmacia Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) a 100 uCi/10⁶ células a 37°C durante 1 hora. Después de lavarse las células, el ⁵¹Cr no excesivamente unido se eliminó por lavado. Se mez-

claron 5000 células diana/pocillo con linfocitos hasta un volumen final de 200 μ l/pocillo. Tras una centrifugación de 3 minutos a 200 x g, las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas. El sobrenadante se recogió usando marcos de recogida (Skatron, Lier, Noruega). El ^{51}Cr liberado en el sobrenadante se contó en un contador gamma universal (Packard Bioscience, Meriden, CT). El porcentaje de liberación específica se calculó usando la fórmula $100\% \times (\text{cpm experimentales} - \text{cpm del fondo}) / (\text{cpm liberables en SDS al 10\%} - \text{cpm del fondo})$ en la que cpm son recuentos por minuto de ^{51}Cr liberado. La liberación total se evaluó por lisis con SDS al 10% (Sigma-Aldrich), y la liberación del fondo se midió en ausencia de células. El fondo fue normalmente < 30% del total para estas líneas celulares.

Ratones y tratamiento. Se compraron ratones CB-17 SCID-Beige de Taconic (Germantown, NY). Se plantaron células tumorales (2×10^6 células) en 100 μ l de Matrigel (BD BioSciences, Bedford, MA) subcutáneamente. Tras la implantación se midieron los tamaños tumorales (diámetros ortogonales máximos). El volumen tumoral se calculó como $4\pi r^3/3$ en la que r es el radio medio del tumor. Los estudios de tratamiento empezaron en grupos de 5 ratones por jaula cuando el diámetro del tumor alcanzó 0,8 cm, normalmente a la semana de implantación del tumor. Los ratones recibieron semanalmente 5 inyecciones intravenosas de linfocitos por la vía retro-orbital, 2×10^6 por inyección junto con 500 U de IL-2 ip. Se administró ip 50 μ g de anticuerpo antiidiotípico 3 días después de cada inyección de linfocitos. Los tamaños tumorales se midieron dos veces por semana. Los experimentos se llevaron a cabo según un protocolo aprobado por el IACUC y se siguieron pautas institucionales para el uso apropiado y humano de animales en investigación.

Análisis estadístico. El crecimiento tumoral se calculó ajustando una pendiente de regresión para cada ratón individual a valores transformados logarítmicos de tamaño tumoral. Las puntuaciones de la pendiente media se retro-transformaron para dar un cálculo estimado del aumento en porcentaje en el tamaño tumoral por día. Las pendientes se compararon entre grupos.

Resultados

Anticuerpos antiidiotípicos para 8H9. Se seleccionaron hibridomas de rata específicos para 8H9 y no reactivos con MoAb murino de control (IgM, IgG1 y otras subclases). Por ELISA, 2E9, 1E12 y 1F11 fueron todos de la subclase IgG2a de rata. El anticuerpo 2E9 se eligió para el resto de los experimentos.

Construcción y expresión de scFv de 8H9. Después de la amplificación por PCR secundaria, el producto de PCR de scFv ajustado con sitios de restricción Sfi I y Not I se insertó en vectores pHEN1. Se realizaron tres rondas de inmunopurificación para enriquecer fagos recombinantes de unión a 2E9. Los fagos eluidos de la tercera ronda de inmunopurificación se usaron para infectar células HB2151 de *E. coli* y se indujeron por IPTG para la expresión. La proteína soluble periplásmica de scFv se dejó reaccionar en placas recubiertas con 2,5 μ g de 2E9/pocillo y se ensayó por ELISA como se describe en Material y procedimientos. El clon 8HpHM9F7-1 se seleccionó para la subclonación. La secuencia de ADN de scFv de 8HpHM9F7-1 concordó con aquellas de las regiones VH y VL del MoAb 8H9. El sobrenadante, los lisados solubles periplásmicos y de sedimentos celulares de 8HpHM9F7-1 se separaron por SDS-PAGE no reductora y se analizaron por transferencia Western. Se encontró una banda de proteína con el peso molecular aparente de 31 kD en el sobrenadante, los extractos periplásmicos y de sedimentos celulares usando anticuerpos dirigidos contra MycTag que reconocieron la secuencia GAPVPDPLEPR. Ninguna banda tal se detectó en células de control o células 8HpHM9F7-1 sin tratamiento con IPTG.

Construcción de sc8H9-CD28-hTCRzeta-pMSCVneo. Usando las secuencias de genes ensambladas se realizaron amplificaciones por PCR secundarias usando cebadores de oligodesoxinucleótidos sintéticos usando los cebadores de oligodesoxinucleótidos sintéticos 355S, 355A para conductor de hCD8 α - scFv - CD28, 365S, 365A para scFv8H9, 379S, 379A para la cadena zeta de hTCR. La construcción génica final conductor de hCD8-8H9scFv-hCD28TM-hCD28^{cit}-TCR se transfectó en la línea de encapsidación anfótrofa GP+envAM12 y se seleccionó en G418.

Enriquecimiento y clonación de líneas de encapsidación por columna de afinidad. Las líneas productoras retrovíricas se enriquecieron por afinidad usando MicroBeads recubiertas con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de rata MACS en el sistema MiniMACS. Tras cada enriquecimiento, el sobrenadante vírico de la línea productora se usó para infectar la línea de eritroleucemia K562. La expresión superficial de scFv de 8H9 en tanto las líneas productoras como la K562 transfectada (3-5 días después de la infección) se midió por inmunofluorescencia usando el anticuerpo antiidiotípico 2E9. Con cada enriquecimiento por afinidad sucesivo (Figura 1A y 1C) de línea productora y posterior subclonación sucesiva (Figura 1B y 1D), la expresión superficial (fluorescencia media) de scFv de 8H9 aumentó y llegó a ser más homogénea para los clones productores (Figura 1A y 1B) y para la línea indicadora K562 (Figura 1C y 1D).

Transducción retroviral de células mononucleares primarias de sangre periférica humana. Tras la activación *in vitro* con anticuerpos solubles dirigidos contra CD3 y dirigidos contra CD28, las células mononucleares primarias de sangre periférica humana se infectaron con el virus del sobrenadante de líneas productoras por centrifugación a 1000 x g durante 60 minutos a temperatura ambiente. A los 21 días del cultivo *in vitro*, cerca del 100% de las células fueron positivas para scFv por FACS (Figura 2). Esta evolución clónica hacia la homogeneidad se encontró en CD4+, CD8+ y las pequeñas poblaciones de CD56+. El MoAb antiidiotípico 2E9 soluble se añadió a 3-10 μ g/ml a los linfocitos transfectados durante 3 días de cada 2 semanas para estimular la expansión clónica de los linfocitos transfectados positivos para scFv (Figura 3). La expresión de scFv fue totalmente constante hasta al menos el día 62 (Figura 2), mientras que las células experimentaron expansión clónica activa de 100 veces. La proporción de células CD8+ aumentó regularmente desde un 20-60% inicial hasta el 90% en el día 40 de cultivo.

Los linfocitos transducidos llevaron a cabo una citotoxicidad eficaz limitada a no MHC *in vitro* contra neuroblastoma y rhabdomyosarcoma. La citotoxicidad *in vitro* contra neuroblastoma NMB-7 (Figura 4A) y LAN-1 (Figura 4B), o rhabdomyosarcoma HTB-82 (Figura 4C) fue eficaz, demostrando todos los inhibibles por el anticuerpo 8H9 especificidad por antígeno. La línea celular Daudi (Figura 4D) no se destruyó debido a que era negativa para antígeno. Esta citotoxicidad fue independiente de la expresión de HLA diana o tipos de HLA. Los linfocitos sin modificar del mismo donante, cultivados bajo las mismas condiciones (100 U/ml de IL2), no mostraron destrucción específica de antígeno (LAK, Figuras 4).

Inhibición de tumor de rhabdomyosarcoma xenoinjertado en ratones SCID. El rhabdomyosarcoma humano era fuertemente reactivo con anticuerpos 8H9, pero no con 5F11 (dirigidos contra G_{D2}). Para estudiar los efectos *in vivo* de linfocitos modificados por genes 8H9scFv-CIR, los inventores usaron 5F11scFv-CIR como control. Los linfocitos modificados por 5F11scFv-CIR podían destruir tumores *in vitro*, pero sólo si eran positivos para G_{D2} (datos no mostrados). Cuando los implantes de tumor subcutáneos crecieron hasta 0,8 cm de diámetro, los ratones se trataron intravenosamente con 2×10^6 linfocitos humanos modificados con el gen más 500 U de IL2 intraperitonealmente una vez a la semana durante un total de 5 semanas. Se administraron ip 50 ug de anticuerpo antiidiotípico 2E9 3 días después de cada infusión de linfocitos. Todos los grupos recibieron IL2. Los grupos de control recibieron tanto sin células + 2E9, linfocitos sin modificar cultivados + 2E9 (LAK), como linfocitos modificados con 5F11scFv-CIR + anticuerpo antiidiotípico 1G8 (específico para el idiotipo 5F11). La supresión del crecimiento tumoral fue más significativa con linfocitos transducidos con el gen 8H9scFv-CIR ($p=0,066$, Figura 5). Aunque los linfocitos modificados con 5F11scFv-CIR también retrasaron el crecimiento tumoral, no fueron diferentes de los linfocitos sin modificar.

Discusión

El uso de vectores retrovíricos para transducir inmunorreceptores quiméricos en linfocitos humanos primarios se ha limitado por la baja eficiencia de transferencia de genes cuando se llevaron a cabo infecciones de sobrenadante vírico. Las velocidades de transferencia en linfocitos T humanos primarios usando virus anfótipos osciló del 1 al 12% (22). Se exploraron varias estrategias para aumentar las velocidades de transducción hasta el 20-50%. Éstas incluyen: (1) usar viriones pseudotipados del virus de la leucemia del mono gibbon (cepa de GaLV SEATO) (20, 23, 24), (2) cocultivar células productoras y diana (25) en las que la seguridad clínica era de cierta preocupación, (3) usar agotamiento de fosfato seguido de centrifugación e incubación a 32°C (22), (4) añadir fibronectina CH296 para potenciar las interacciones virus/linfocito (26). Más recientemente, Eshhar y col. describieron una construcción dicistrónica que estaba constituida por scFv-CD28-(y proteína verde fluorescente (GFP), en la que esta última se usó para monitorizar la transducción génica y para enriquecer la línea productora (7). En el estudio de los inventores, los inventores usaron anticuerpo antiidiotípico para seleccionar líneas productoras que expresan scFv de alta superficie con eficiencia mejorada de transducción génica. Y, lo que es más importante, linfocitos transducidos por receptores de fusión quiméricos de CD-28 proliferaron en presencia del MoAb antiidiotípico para convertirse en "monoclonales" con respecto a la expresión de scFv, en tanto las poblaciones de CD4+ como de CD8+. Estos linfocitos poseían actividad tumoricida específica de antígeno tanto *in vitro* como *in vivo* que estaba limitada a no MHC. Se necesitarán otros estudios tanto si las células positivas para CD56 (supuestamente células NK) adquieren capacidades similares como si no, aunque la activación de células NK por la señalización de CD28 se ha informado previamente (27).

Los inventores han mostrado que los anticuerpos antiidiotípicos pueden facilitar la selección de clones en la construcción de proteínas de fusión de scFv solubles o scFv de superficie unido a células. Los inventores han aplicado satisfactoriamente tecnología similar al sistema de antígeno de G_{D2} (datos sin publicar). Siendo inmunoglobulinas, su estructura, estabilidad, bioquímica son generalmente conocidas. Esto es a diferencia de los antígenos naturales en los que cada sistema individual tiene sus propiedades únicas y frecuentemente difíciles de predecir. Como antígenos sustitutos, los MoAb antiidiotípicos son ideales para la normalización y el control de calidad, especialmente para las investigaciones clínicas iniciales de antígenos de carbohidrato o cuando no se entienda completamente la naturaleza del antígeno.

La ventaja de usar anticuerpo antiidiotípico para la purificación por afinidad y para la expansión clónica de linfocitos modificados con genes es múltiple. Para preparar CTL policlonales específicos para una diana tumoral, los linfocitos tienen que pulsarse periódicamente *in vitro* con las células tumorales (21). Claramente, esto puede crear problemas de seguridad (contaminación tumoral) y de control de calidad. A diferencia, el MoAb antiidiotípico puede prepararse según condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP) convencionales, con facilidad de manipulación tanto *in vitro* como *in vivo*. Otra ventaja del MoAb antiidiotípico es su capacidad para marcar la población clónica de linfocitos específicos de diana. Aunque los tetrámeros pueden marcar TCR y clones de linfocitos T, se requiere la identidad del antígeno de péptido y esta tecnología no está fácilmente disponible. Además, el MoAb antiidiotípico puede marcar clones de linfocitos T *in vivo* cuando se radiomarcen, una opción que todavía no es posible con tetrámeros. Finalmente, la posibilidad del MoAb antiidiotípico para activar los linfocitos transducidos *in vivo* es atrayente, especialmente cuando las células tumorales son pobremente inmunogénicas o cuando apenas están distribuidas. Aunque los inventores usaron MoAb antiidiotípico en sus experimentos con ratones SCID, esta estrategia requiere claramente optimización adicional después de que esté disponible una mejor comprensión de la biología *in vivo* de estas células transducidas.

A pesar de estos alentadores resultados, tendrán que considerarse otros problemas estructurales de tecnología de CIR para la futura optimización. La elección del espaciador apropiado (entre scFv y la molécula de señalización), el dominio transmembranario y las moléculas de señalización pueden ser importantes (28). El que los linfocitos T modificados con scFv de 8H9 proliferen con anticuerpo antiidiotípico y destruyan células tumorales positivas para antígeno argumenta plenamente que el dominio transmembranario de CD28 en este diseño de CIR no requiere una horquilla

de CD8, permitiendo la eficaz interacción con antígenos solubles, además de unidos a célula. Esta interacción efectúa señalización positiva de linfocitos, para tanto la supervivencia como la activación, como se ha informado previamente para la proteína de fusión quimérica similar que contiene tanto cadenas de CD28 como de TCR (13). Es posible que el nivel de activación pueda mejorarse mediante la adición de una horquilla o la adopción de otros dominios transmembrana-
 5 branarios, como se ha sugerido previamente (29). Los informes previos han sugerido que un espaciador de horquilla de IgG humana-CH2-Ch3 puede optimizar la actividad de linfocitos T, la expresión superficial y la afinidad por diana (28, 30). Además, el uso de otros dominios o moléculas en la dirección 3' en la ruta de activación de linfocitos T podría posiblemente vencer los defectos de los linfocitos T comúnmente encontrados en pacientes con cáncer (31). Otra variable en la activación de linfocitos T es la afinidad de interacción entre el complejo de TCR y el péptido de
 10 MHC (32). Necesita probarse adicionalmente si un receptor quimérico de scFv de baja afinidad puede imitar mejor la interacción de TRC sin tratamiento previo. Una densidad óptima de CIR para la activación de linfocitos T es probablemente importante (33), ya que la señalización de TCR en exceso puede desencadenar muerte prematura. Además, como la mayoría de los antígenos diana no son específicos de tumor, puede ser útil normalizar el nivel de expresión de CIR de forma que un linfocito T manipulado sólo esté óptimamente activado por un estrecho umbral de antígeno.

15 La elección del sistema tumoral y la diana de antígeno determinarán probablemente el éxito clínico de la estrategia de CIR. Los tumores linfoides primarios, por ejemplo, los linfomas de linfocitos B, tienen distintos atributos.

Debido a su tropismo innato, los linfocitos T alojan a estos linfomas. Además, estos tumores tienen antígenos tumorales únicos con expresión homogénea que no se modulan a partir de la superficie celular (por ejemplo, CD20). Además, estos tumores de linfocitos B expresan moléculas coestimuladoras (30). La mayoría de los tumores sólidos carecen de estos atributos. Sin embargo, los cánceres metastásicos en ganglios linfáticos, sangre y médula ósea son compartimentos únicos en los que puede aplicarse la tecnología de CIR. Dependiendo del compartimento, la elección como diana de linfocitos T puede requerir diferentes receptores de quimiocinas o moléculas de adhesión. Por ejemplo,
 20 mientras que se requiere L-selectina para el alojamiento en órganos linfoides, su función para el tráfico a otros órganos metastásicos tales como la médula está menos definida.

En terapias de células adoptivas, la precisa evaluación de la cantidad y la persistencia de estas células *in vivo*, además de su distribución y función dentro de tejidos, es crítica (34). En estudios de terapia con linfocitos T, esto es de particular importancia ya que muchas células infundidas experimentarán muerte inducida por activación *in vivo*
 30 (35), o puede producirse inmunoeeliminación de células modificadas con genes, especialmente tras inyecciones repetidas (36). El desarrollo de procedimientos sensibles, precisos y reproducibles para cuantificar células marcadas con genes en sangre periférica y tejidos es esencial para definir el destino a largo plazo de células adoptivamente transferidas. Mientras que los procedimientos de PCR y RT-PCR cuantitativa son ideales para estudiar extractos de tejidos,
 35 el MoAb antiidiotípico proporcionará herramientas útiles para enumerar células positivas para scFv individuales en sangre, médula y tumor. Además, también pueden ser posibles procedimientos de obtención de imágenes no invasivos que usan MoAb antiidiotípico radiomarcado. Similar al gen marcador HSV-tk que permite que las células sean rastreadas y cuantificadas por el sustrato ¹³¹I-FIAU o ¹²⁴I-FIAU, el MoAb antiidiotípico marcado con tanto ¹³¹I como ¹²⁴I también puede aprovechar la instrumentación y el software desarrollado para la obtención de imágenes por SPECT y PET/micro-PET, respectivamente. Estas herramientas pueden proporcionar precisión sin precedentes e información
 40 dinámica en el tráfico de células en ensayos en pacientes.

Referencias

- 45 1. Daniel, P. T., Kroidl, A., Cayeux, S., Bargou, R., Blankenstein, T. y Dorken, B. Costimulatory signals through B7.1/CD28 prevent T cell apoptosis during target cell lysis. *J Immunol*, 159: 3808-3815, 1997.
2. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. y Schindler, D. G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 720-724, 1993.
3. Stancovski, I., Schindler, D. G., Waks, T., Yarden, Y., Sela, M. y Eshhar, Z. Targeting of T lymphocytes to Neu/HERe-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J Immunol*, 151: 6577-6582, 1993.
- 55 4. Moritz, D., Wels, W., Mattern, J. y Groner, B. Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc. Natl Acad Sci, USA*, 91: 4318-4322, 1994.
5. Wels, W., Moritz, D., Schmidt, M., Jeschke, M., Hynes, N. E. y Groner, B. Biotechnological and gene therapeutic strategies in cancer treatment. *Gene*, 159: 73-80, 1995.
6. Hwu, P., Shafer, G. E., Treisman, J., Schindler, D. G., Gross, G., Cowherd, R., Rosenberg, S. A., y Eshhar, Z. Lysis of ovarian cancer cells by human lymphocytes redirected with a chimeric gene composed of an antibody variable region and the Fc-receptor gamma-chain. *J. Exp. Med.*, 178: 361-369, 1993.
- 65 7. Eshhar, Z., Waks, T., Bendavid, A. y Schindler, D. G. Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells. *J Immunol Methods*, 248: 67-76, 2001.

8. **Rosenberg, S. A.** Cell transfer therapy: clinical applications. In: V. T. J. DeVita, S. Hellman y S. A. Rosenberg (eds.), *Biologic therapy of cancer*, second edition, pp. 487-506. *Philadelphia: J.B. Lippincott Company*, 1995.

9. **Yang, A.-G. y Chen, S.-Y.** A new class of antigen-specific killer cells. *Nat Biotechnol*, 15: 46-51, 1997.

10. **Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H. y Blaese, R. M.** *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 256: 1550, 1992.

11. **Wei, M. X., Tamiya, T. y Chase, M.** Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2 B1 gene. *Hum Gene Ther*, 5: 969, 1994.

12. **Weijtens, M. E., Willemsen, R. A., Valerio, D., Stam, K. y Bolhuis, R. L.** Single chain Ig/gamma gene-redi-rected human T lymphocytes produce cytokines, specifically lyse tumor cells, and recycle lytic capacity. *J Immunol*, 157:836-843, 1996.

13. **Finney, H. M., Lawson, A. D. G., Bebbington, C. R. y Weir, N. C.** Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol*, 161: 2791-2797, 1998.

14. **Thanavala, Y. M., Brown, S. E., Howard, C. R., Roitt, I. M. y Steward, M. W.** A surrogate hepatitis B virus antigenic epitope represented by a synthetic peptide and an internal image antiidiotypic antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 164: 227-236, 1986.

15. **Wagner, U., Schlebusch, H., Kohler, S., Schmolling, J., Grunn, U. y Krebs, D.** Immunological responses to the tumor-associated antigen CA125 in patients with advanced ovarian cancer induced by the murine monoclonal anti-idiotypic vaccine ACA125. *Hybridoma*, 16: 33-40, 1997.

16. **Modak, S., Kramer, K., Humayun, G., Guo, H. F. y Cheung, N. K. V.** Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors. *Cancer Research*, 61: 4048-4054, 2001.

17. **Cheung, N. K., Saarinen, U., Neely, J., Landmeier, B., Donovan, D. y Coccia, P.** Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Research*, 45: 2642-2649, 1985.

18. **Cheung, N. K., Canete, A., Cheung, I. Y., Ye, J. N. y Liu, C.** Disialoganglioside GD2 anti-idiotypic monoclonal antibodies. *International Journal of Cancer*, 54: 499-505, 1993.

19. **Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 4350-4354, 1979.

20. **Krause, A., Guo, H. F., Tan, C., Cheung, N. K. V. y Sadelain, M.** Antigen-dependent CD-28 signaling enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 188: 619-626, 1998.

21. **Koehne, G., Gallardo, H. F., Sadelain, M. y O'Reilly, R. J.** Rapid selection of antigen-specific T lymphocytes by retroviral transduction. *Blood*, 96: 109-117, 2000.

22. **Bunnell, B. A., Muul, L. M., Donahue, R. E., Blaese, R. M. y Morgan, R. A.** High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proceeds of the National Academy of Science, USA*, 92: 7739-7743, 1995.

23. **Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C. y Eiden, M. V.** Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol*, 1991: 2220-2224, 1991.

24. **Lam, J. S., Reeves, M. E., Cowherd, R., Rosenberg, S. A. y Hwu, P.** Improved gene transfer into human lymphocytes using retroviruses with gibbon ape leukemia virus envelope. *Hum Gene Ther*, 7: 1415-1422, 1996.

25. **Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C. y Bordignon, C.** HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*, 276: 1719-1723, 1997.

26. **Pollok, K. E., Hanenberg, H., Noblitt, T. W., Schroeder, W. L., Kato, I., Emanuel, D. y Williams, D. A.** High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J Virol*, 72: 4882-4892, 1998.

27. **Galea-Lauri, J., Darling, D., Gan, S.-U., Krivochchapov, L., Kuiper, M., Gaken, J., Souberbielle, B. y Farzaneh, F.** Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J Immunol*, 163: 62-70, 1999.

28. Patel, S. D., Moskalenko, M., Smith, D., Maske, B., Finer, M. H. y McArthur, J. G. Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function. *Gene Therapy*, 6: 412-419, 1999.
29. Fitzer-Attas, C. J., Schindler, D. G., Waks, T. y Eshhar, Z. Harnessing Syk family tyrosine kinases as signaling domains for chimeric single chain of the variable domain receptors: optional design for T cell activation. *J Immunol*, 160: 145-154, 1998.
30. Jensen, M., Tan, G., Forman, S., Wu, A. M. y Raubitschek, A. CD20 is a molecular target for scFvFc: receptor redirected T cells: implications for cellular immunotherapy of CD20+ malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant*, 4: 75-83, 1998.
31. Eshhar, Z. y Fitzer-Attas, C. J. Tyrosine kinase chimeras for antigen-selective T-body therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 31: 171-182, 1998.
32. Valitutti, S. y Lanzavecchia, A. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunology Today*, 18: 299-304, 1997.
33. Varez-Vallina, L. y Russell, S. J. Efficient discrimination between different densities of target antigen by tetracycline-regulatable T bodies. *Hum Gene Ther*, 10: 559-563, 1999.
34. Yee, C., Riddell, S. R. y Greenberg, P. D. *In vivo* tracking of tumor-specific T cells. *Curr Opin Immunol*, 13: 141-146, 2001.
35. Xiaoning, R. T., Ogg, G. S., Hansasuta, P., Dong, T., Rostron, T., Luzzi, G., Conlon, C. P., Screaton, G. R., McMichael, A. J. y Rowland-Jones, S. Rapid death of adoptively transferred T cells in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood*, 93: 1506-1510, 1999.
36. Riddell, S. R., Elliott, M., Lewinsohn, D. A., Gilbert, M. J., Wilson, L., Manley, S. A., Lupton, S. D., Overell, R. W., Reynolds, T. C., Corey, L. y Greenberg, P. D. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med*, 2: 216-223, 1996.

Séptima serie de experimentos

Radioinmunolectión como diana de rhabdomiosarcoma humano (RMS) usando anticuerpo monoclonal (MoAb) 8H9

El rhabdomiosarcoma metastásico es un tumor sensible a quimioterapia. Sin embargo, la cura es difícil debido al fracaso para erradicar la enfermedad residual mínima (ERM). El MoAb puede tener posibilidades para la elección como diana selectiva de terapia para ERM. Se han descrito pocos MoAb de utilidad clínica para RMS. Los inventores informaron previamente de la amplia reactividad tumoral de un MoAb murino 8H9 con baja/sin tinción de tejidos humanos normales. El antígeno diana se expresó normalmente de un modo homogéneo entre tumores neuroectodérmicos (neuroblastoma, sarcoma de Ewing, PNET, tumores cerebrales), mesenquimatosos (RMS, osteosarcoma, DSRT, STS) y epiteliales seleccionados. De 25 tumores de RMS, 24 se tiñeron de forma positiva. La radioinmunolocalización de xenoinjertos de RMS subcutáneos en ratones SCID se estudió usando 8H9 radiomarcados. Tras la inyección iv de 120 uCi de ¹²⁵I-8H9, la captación tumoral selectiva fue evidente a 4 a 172 h después de la inyección con una T_{1/2} en sangre de 0,8 h y T_{1/2} de 26 h. Las relaciones medias de tumor/tejido fueron óptimas a 172 h (para pulmón 4, riñón 7, hígado 9, bazo 10, fémur 16, músculo 21, cerebro 45). Las relaciones promedio de tumor/sangre fueron 0,7, 1,4 y 1,6, y la captación tumoral fue 9,5 ± 3,4, 13,3 ± 1,5 y 5,3 ± 0,9% de la dosis inyectada por g a 24, 48 y 172 h, respectivamente. La elección como diana selectiva de 8H9 para xenoinjertos de RMS sugiere sus posibilidades de radioinmunodetección y terapia de elección de diana basada en MoAb de ERM en RMS.

Radioinmunolectión como diana de rhabdomiosarcoma humano usando anticuerpo monoclonal 8H9

Resumen

Fin: Aunque el rhabdomiosarcoma metastásico (RMS) es sensible a quimioterapia y radioterapia, pocos pacientes se curan. El 8H9, un anticuerpo monoclonal IgG₁ murino (MoAb), reconoce un único antígeno de superficie de la célula que tiene expresión limitada en tejidos normales, pero está ampliamente distribuido en tumores neuroectodérmicos, epiteliales y mesenquimatosos que incluyen RMS. En este informe, los inventores prueban su potencial de inmunolectión como diana en ratones con RMS humano subcutáneo.

Diseño experimental: Ratones sin pelo atímicos con xenoinjertos de RMS establecidos se inyectaron intravenosamente con ¹²⁵I-8H9 o ¹²⁵I-MoAb de control. La inmunorreactividad con ¹²⁵I-8H9 se probó en el MoAb antiidiotípico para 8H9 de rata en fase sólida 2E9. Se obtuvieron imágenes de los ratones usando una gammacámara y se determinó la biodistribución de anticuerpos radiomarcados. Este efecto antitumoral se estudió tras la administración intravenosa (IV) de 18,5 MBq de ¹³¹I-8H9.

Resultados: Tras la inyección iv de 4,44 MBq de ^{125}I -8H9, la captación tumoral selectiva fue evidente 4 a 172 h después de la inyección. La captación tumoral promedio fue $11,5 \pm 3,9$, $15,1 \pm 3,7$ y $5,4 \pm 1,2\%$ de dosis inyectada por g a 24, 48 y 172 h, respectivamente. Las relaciones medias de tumor/tejido fueron óptimas a 172 h (para pulmón, 4, riñón 6, hígado 7, bazo 11, fémur 14, músculo 18, cerebro 48). Las relaciones de tumor/tejido mejoraron cuando se inyectó una dosis más baja (0,74 MBq) de ^{125}I -8H9. No se observaron anomalías hematológicas ni histológicas. Los ratones inyectados con control negativo para ^{125}I no demostraron captación tumoral específica. A diferencia de los ratones tratados con control con ^{131}I que mostraron progresión tumoral no disminuida, los ratones tratados con 18,5 MBq de ^{131}I -8H9 mostraron supresión tumoral de $>50\%$.

Conclusiones: El 8H9 radiomarcado eligió eficazmente como diana xenoinjertos de RMS y puede tener una posible función clínica en inmunodetección e inmunoterapia.

Introducción

El rhabdomyosarcoma metastásico (RMS) está asociado a un mal pronóstico con tasas de cura informadas de no más del 25% a pesar de la quimiosensibilidad y radiosensibilidad demostradas (1, 2, 3). La quimioterapia mieloablativa con rescate autólogo de citoblastos ha fracasado en el impacto sobre la supervivencia (4, 5). El fracaso en la erradicación de la enfermedad residual mínima (ERM) conduce a recaídas locales y a distancia para RMS tanto alveolar como embrionario. Por tanto, se garantizan estrategias alternativas para elegir como diana ERM. Se ha informado recientemente de anticuerpos monoclonales (MoAb) que son de beneficio clínico en el tratamiento de tumores sólidos. En niños con neuroblastoma (NB) de alto riesgo, la adición del anticuerpo dirigido contra el gangliósido GD_2 3F8 a una solución multimodalidad ha mejorado significativamente el pronóstico (6) sin aumentar la toxicidad a largo plazo (7). Los anticuerpos radiomarcados pueden administrar selectivamente radiación a tumores humanos. La demostración de la unión específica a xenoinjertos de NB por ^{131}I -3F8 se demostró inicialmente en modelos de xenoinjerto (8). De hecho, ^{131}I -3F8 produjo la ablación completa de xenoinjertos de NB en ratones sin pelo atímicos con toxicidad reversible (9). Basándose en los cálculos de farmacocinética y dosimetría para tumores y tejidos normales, en pacientes con NB se iniciaron protocolos clínicos de radioinmunodetección y radioinmunoterapia utilizando ^{131}I -3F8. Posteriormente se demostró la elección como diana eficaz y específica de NB en seres humanos (10,11), y posteriormente se utilizó tanto para la detección como la terapia.

La adopción de una estrategia similar a RMS se ha limitado por la escasez de antígenos que puedan ser elegidos como diana por MoAb. La mayoría de los antígenos expresados en RMS tienen una localización tanto nuclear como citoplásmica que los hace inaccesibles al MoAb, o están coexpresados en tejidos normales, limitándose así su utilidad clínica (Tabla 1). El transcrito de fusión PAX-FKHR es específico para RMS alveolar. Se ha usado en la detección de micrometástasis en RMS alveolar por RT-PCR (12, 13) y como antígeno tumoral para la generación de linfocitos T citotóxicos (14). Sin embargo, su localización nuclear protege la proteína intacta de las soluciones de elección como diana basadas en anticuerpo. Además, para la variante embrionaria más frecuente, tales marcadores específicos ya no están disponibles. Los inventores describieron recientemente un novedoso antígeno tumoral con un peso molecular aparente de 58 kD (15) reconocido por el MoAb 8H9. Esta glicoproteína se expresa en la superficie celular de un amplio espectro de tumores sólidos en la infancia y adultos que incluye tanto RMS alveolar como embrionario y tiene distribución limitada en tejidos normales. Los inventores informan ahora de la elección como diana *in vivo* de 8H9 marcado con ^{125}I y ^{131}I en xenoinjertos de RMS humanos.

TABLA 1

Antígenos previamente informados en rhabdomyosarcoma

Antígeno	Localización	Reactividad cruzada
Desmina (22)	Citoplasma	Músculo esquelético, cardíaco y liso
Citoqueratina (23)	Citoplasma	Células epiteliales
EMA (23)	Citoplasma	Células epiteliales
Vimentina (23)	Citoplasma	Todos los tejidos mesenquimatosos
NSE (23)	Citoplasma	Tejido cerebral y neural
MYOD1 (17)	Núcleo	Limitado a RMS
Ag BW575 (18)	membrana celular	Células neurales
Miosina (19)	membrana celular	Células musculares
5.1 H11 (25)	Citoplasma	Células neurales
Antígeno	Localización	Reactividad cruzada
Receptor de IGF1 (21)	membrana celular	Células normales
Receptor acetilcolínico fetal (20)	membrana celular	Músculos extraoculares, timo, músculo esquelético desnervado

ES 2 357 425 T3

TABLA 2

% de dosis inyectada/gramo de ^{125}I -8H9 distribuido en xenoinjertos de HTB82 y tejidos normales
24, 48 y 172 horas después de la inyección

	24 h (n=9 ratones)	48 h (n=9 ratones)	172 h (n=8 ratones)
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Suprarrenal	1,4 $\pm$ 1,6	1,4 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,3
Vejiga	2,6 $\pm$ 1,2	2,9 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,6
Sangre	14,1 $\pm$ 3,0	10,7 $\pm$ 2,1	3,2 $\pm$ 0,9
Cerebro	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0
Fémur	1,4 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,1
Corazón	4,3 $\pm$ 1,9	2,9 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,2
Riñón	3,9 $\pm$ 1,6	3,0 $\pm$ 0,7	0,8 $\pm$ 0,3
Intestino grueso	1,7 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1
Hígado	4,0 $\pm$ 1,7	2,2 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,3
Pulmón	5,7 $\pm$ 3,5	5,3 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 0,5
Músculo	1,2 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,1
Piel	2,3 $\pm$ 1,6	2,5 $\pm$ 1,5	0,6 $\pm$ 0,4
Intestino delgado	1,5 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1
Columna vertebral	2,1 $\pm$ 0,8	1,7 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,2
Bazo	5,8 $\pm$ 2,4	3,3 $\pm$ 0,8	0,5 $\pm$ 0,2
Estómago	2,4 $\pm$ 2,1	1,6 $\pm$ 0,7	0,5 $\pm$ 0,4
Tumor	11,5 $\pm$ 3,9	15,1 $\pm$ 3,7	5,4 $\pm$ 1,2

TABLA 3

Relaciones de tumor:no tumor en ratones inyectados con 0,74 MBq en comparación con 4,44 MBq de ^{125}I -8H9 172 h después de la inyección (5 ratones por grupo)

	0,74 MBq	4,44 MBq
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Suprarrenal	26,3 $\pm$ 20,4	12,5 $\pm$ 3,6
Vejiga	35,0 $\pm$ 31,4	7,9 $\pm$ 1,5
Sangre	2,6 $\pm$ 1,7	1,7 $\pm$ 0,3
Cerebro	150,9 $\pm$ 36,1	51,9 $\pm$ 20,1
Fémur	26,7 $\pm$ 20,6	13,7 $\pm$ 2,0
Corazón	11,5 $\pm$ 8,5	5,7 $\pm$ 1,0
Riñón	8,4 $\pm$ 3,5	6,5 $\pm$ 1,4
Intestino grueso	32,3 $\pm$ 18,6	23,0 $\pm$ 5,0
Hígado	13,0 $\pm$ 6,7	7,0 $\pm$ 0,9
Pulmón	7,7 $\pm$ 6,0	4,1 $\pm$ 0,6
Músculo	33,0 $\pm$ 22,3	18,9 $\pm$ 4,4
Piel	13,0 $\pm$ 8,9	7,2 $\pm$ 3,1
Intestino delgado	29,4 $\pm$ 17,0	20,8 $\pm$ 6,4
Columna vertebral	20,4 $\pm$ 11,1	10,3 $\pm$ 3,7
Bazo	16,4 $\pm$ 11,3	11,9 $\pm$ 2,0
Estómago	23,4 $\pm$ 15,9	14,5 $\pm$ 4,3
Tumor	1,0 $\pm$ 0	1,0 $\pm$ 0

TABLA 4

Biodistribución de ^{125}I -8H9 y ^{125}I -2C9 en ratones con xenoinjertos de HTB82 120 h después de la inyección
(los valores representan el % de dosis inyectada/gramo)

	^{125}I -8H9	^{125}I -2C9
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Suprarrenal	0,5 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,4
Vejiga	1,5 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,4
Sangre	4,6 $\pm$ 0,7	8,4 $\pm$ 1,4
Cerebro	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
Fémur	0,6 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2
Corazón	1,0 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,4

		¹²⁵ I-8H9	¹²⁵ I-2C9
		Media ± DE	Media ± DE
5	Riñón	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,4
	Intestino grueso	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,1
	Hígado	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1
	Pulmón	2,9 ± 0,7	5,3 ± 1,5
	Músculo	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
10	Piel	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,3
	Piel	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,3
	Intestino delgado	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
	Columna vertebral	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,5
	Bazo	1,3 ± 0,6	2,2 ± 0,5
15	Estómago	0,5 ± 0,2	1,1 ± 0,2
	Contenido estomacal	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2
	Tumor	7,2 ± 0,9	2,5 ± 0,9

TABLA 5

Parámetros medios hematológicos y funcionales hepáticos en ratones (5 por grupo) inyectados con ¹³¹I-8H9

	Día 15	Día 30	Valores normales informados	
25	Hemograma completo			
	Hemoglobina (g/dl)	11,2 ± 0,3	13,1 ± 3,2	11,0-14,0
	Leucocitos (10 ³)	4,43 ± 0,7	6,2 ± 2,7	2,8-9,2
30	Plaquetas (10 ³)	1309 ± 371	1300 ± 798	1523 ± 218
	Segmentadas (%)	46,8 ± 9,9	42,5 ± 11,4	42-45,5
	Linfocitos (%)	49,6 ± 11,6	51,2 ± 16,2	54,5-58
	Pruebas funcionales hepáticas (mezcla de sueros)			
35	Fosfatasa alcalina (U/l)	96	174	66-258
	ALT (U/l)	36	33	62-121
	AST (U/l)	169	93	87-318
	GGT (U/l)	0	0	
	Albúmina (g/dl)	3,1	4,8	2,5-4,8
40	Proteína total (g/dl)	5,5	5,1	3,5-7,2
	Bilirrubina total (mg/dl)	0,1	0,3	0,1-0,9

Materiales y procedimientos

Anticuerpos monoclonales

MoAb 8H9. El MoAb murino 8H9 se produjo por hiperinmunización de ratones BALB/c con neuroblastoma humano como se ha descrito previamente (15).

MoAb 2C9. Usando procedimientos similares, los ratones se inmunizaron con cáncer de mama humano y se aisló el hibridoma que demostraba especificidad contra citoqueratina 8.

MoAb antiidiotípicos. Se produjeron MoAb antiidiotípicos de rata para 8H9 por inmunización de ratas LOU/CN con 8H9 purificado. Tras la hibridación *in vitro* con los mielomas SP2/0 ó 8653 se seleccionaron tres clones IgG_{2a} (2E9, 1E12 y 1F11) para su alta unión y especificidad por ELISA. Cuando se probaron contra un panel de otros 23 mielomas no se encontró reactividad cruzada. Los hibridomas antiidiotípicos se clonaron y el anticuerpo 2E9 se eligió para la producción a gran escala usando el biorreactor de alta densidad MiniPERM (Unisyn Technologies, Hopkinton, MA). Los anticuerpos antiidiotípicos se purificaron adicionalmente por cromatografía de afinidad en proteína G (Hitrap G, Pharmacia, Piscataway, NJ) y se filtraron a través de un filtro Millipore de 0,2 µm (Millipore Inc., Bedford, MA).

Líneas celulares

Se compraron la línea celular de RMS HTB82 y la línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas HTB119 (control negativo para 8H9) de la Colección americana de cultivos tipo, Bethesda, MD. Las líneas celulares se cultivaron en RPMI (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) complementado con suero de ternero recién nacido al 10% (Hyclone, Logan, PA), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). Las células se cultivaron en un incubador a 37°C y se recogieron usando EDTA 2 mM.

Yodación

Se dejó que el MoAb 8H9 reaccionara durante 5 min con ^{125}I o ^{131}I (NEN Life Sciences, Boston, MA) y cloramina T (1 mg/ml en tampón fosfato 0,3 M, pH 7,2) a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo metabisulfito de sodio (1 mg/ml en tampón fosfato 0,3 M, pH 7,2) durante 2 min. El MoAb radiomarcado se separó del yodo libre usando una columna de resina A1GX8 (BioRad, Richmond, CA) saturada con HSA al 1% (New York Blood Center Inc., Melville Biologics Division, Nueva York, NY) en PBS, pH 7,4. Las fracciones radiactivas pico se reunieron y la radiactividad (MBq/ml) se midió usando un calibrador de radioisótopos (Squibb, Princeton, NJ). Se calcularon la incorporación de yodo y las actividades específicas. Se usó precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) para evaluar el porcentaje de proteína unida a ^{125}I o ^{131}I . Se realizó cromatografía en capa fina ejecutando 1 μl de ^{125}I -8H9 en un gel de sílice sobre placa de CCF de vidrio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) y escaneándola con System 200 Imaging Scanner (Bioscan, Washington, DC).

Inmunorreactividad in vitro de 8H9 yodado

La inmunorreactividad de anticuerpo marcado se determinó por un radioinmunoensayo en fase sólida de microtítulo específico desarrollado usando el anticuerpo antiidiotípico para 8H9 2E9 como antígeno. Brevemente, las placas de microtitulación se recubrieron previamente con concentraciones decrecientes de 2E9. Se añadieron diluciones apropiadas de ^{125}I -8H9 por duplicado. La unión se maximizó por incubaciones seriadas a 4°C en 3 placas de antígenos separadas durante periodos de 1 h, 4 h y durante la noche, respectivamente. El porcentaje de actividad unida se sumó a cada dilución para obtener la máxima unión en porcentaje. Se llevó a cabo un ensayo similar para evaluar la inmunorreactividad de ^{131}I -8H9.

La inmunorreactividad también se midió mediante la unión específica a sedimentos celulares. Las células HTB82 se suspendieron en tubos Eppendorf a concentraciones de 10^8 , 10^7 y $10^6/\text{ml}$ en 100 μl de medio. Se añadieron 100 μl de dilución apropiada de ^{125}I -8H9 y se dejaron reaccionar a 37°C durante 60 min. Los tubos se centrifugaron posteriormente a 1400 rpm x 10 min. La radiactividad en 100 μl de sobrenadante se contó usando el contador gamma Minaxi (Packard BioScience, Downer's Grove, IL) y se comparó con recuentos totales en una muestra de control que estaba constituida por medio sin células. La unión en porcentaje se calculó como (cpm experimentales/cpm de control) x 100%. Como control se usó la línea celular negativa para 8H9 HTB 119.

*Estudios en animales**Biodistribución y farmacocinética*

Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo según un protocolo aprobado por el IACUC y se siguieron pautas institucionales para el uso apropiado y humano de animales en investigación. Se compraron ratones sin pelo atímicos (Ncr nu/nu) de NCI, Frederick MD. Se xenoinjertaron subcutáneamente con la línea celular HTB82 (2×10^6 células/ratón) suspendida en 100 μl de Matrigel (Beckton-Dickinson BioSciences, Bedford, MA) en la ijada derecha. Después de 3-4 semanas se seleccionaron los ratones que portaban tumores de 1 a 1,5 cm en la dimensión más larga. Los ratones se inyectaron intravenosamente (plexo retro-orbital) con 0,74 MBq o 4,44 MBq de ^{125}I -8H9, o con 4,44 MBq de ^{125}I -2C9. Se anestesiaron con ketamina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA) intraperitonealmente y se obtuvieron imágenes a diversos intervalos de tiempo con una gammacámara (ADAC, Milpitas, CA) equipada con un colimador de uso general de alta resolución para ^{131}I y rejillas de rayos X para tiroides para ^{125}I . Las muestras de sangre seriadas se recogieron a 5 min, 1, 2, 4, 8, 18, 24, 48, 72, 120, 144 y 172 h para determinar la eliminación de la sangre de ^{125}I -8H9. Los grupos de ratones inyectados con ^{125}I -8H9 se sacrificaron a 24 h, 48 h, 120 h o 172 h inmediatamente después de la obtención de imágenes. Se obtuvieron imágenes de los ratones inyectados con ^{125}I -2C9 tanto a 120 h (y luego se sacrificaron) como a 172 h. Se pesaron muestras de sangre (muestreo cardíaco), corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, estómago, suprarrenal, intestino delgado, intestino grueso, columna vertebral, fémur, músculo, piel, cerebro y tumor y se midió la radiactividad con un contador gamma Minaxi. Los resultados se expresaron como porcentaje de dosis inyectada por gramo y se determinó la biodistribución.

Toxicidad

Se inyectaron ratones sin pelo atímicos sin xenoinjertos cada uno con 4,44 MBq de ^{131}I -8H9. Los grupos de ratones se sacrificaron a los 15 y 30 días. Se llevaron a cabo hemogramas completos en cada ratón mediante sangrado terminal y se realizaron pruebas funcionales hepáticas en mezclas de sueros. Se llevaron a cabo necropsias completas que incluían exámenes macroscópicos e histológicos para evaluar la posible toxicidad de ^{131}I -8H9.

Evaluación de la actividad antitumoral

Se establecieron xenoinjertos de RMS como se ha descrito anteriormente. Sus ejes perpendiculares máximos se midieron usando calibradores en grupos de control y de tumor. Después de 3 semanas, los ratones que portaban tumores de aproximadamente 0,7 cm^3 (el volumen tumoral se calculó usando la fórmula $V=4\pi r^3/3$ en la que r=radio medio) se seleccionaron y se inyectaron con 18,5 MBq de ^{131}I -8H9 o ^{131}I -3F8 (3F8 se usó como anticuerpo de control negativo). Los volúmenes tumorales seriados promedio y los pesos corporales se monitorizaron en los dos grupos y se compararon con el tiempo. Los ratones se sacrificaron según las pautas publicadas en la publicación del NIH nº 85-23

(“Principles of Laboratory Animal Care”). Los datos se expresan como aumento o disminución en % en el volumen tumoral cuando se comparó con la medición inicial en el día 0 de tratamiento.

Resultados

Immunorreactividad

La proteína unida a ^{125}I y ^{131}I como se evaluó por precipitación de TCA dio como promedio $96 \pm 4,2\%$ y $98 \pm 2,2\%$, respectivamente, para 8H9 y $>95\%$ para los anticuerpos de control 2C9 y 3F8. La CCF demostró un pico libre de yodo del 1%, siendo el 99% proteína unida. La inmunorreactividad máxima promedio como se mide por RIA en fase sólida usando el anticuerpo antiidiotípico para 8H9 2E9 como antígeno fue el $67 \pm 26\%$ para 8H9 y el 11% para 2C9. La máxima inmunorreactividad medida por el ensayo de unión a sedimento celular fue el 83% para 8H9, siendo la máxima unión a la línea celular de control negativa HTB119 el 9%. 2C9 demostró la máxima unión del 6% en el sedimento celular de HTB82.

Obtención de imágenes

Los animales toleraron inyección intravenosa sin efectos de enfermedad aparentes. La localización tumoral pudo detectarse en animales de los que se obtuvieron imágenes con ^{125}I -8H9 ya 4 horas después de la inyección. A las 24 h, la localización del tumor era obvia junto con alguna mezcla de sangres, hígado y captación de bazo. A las 48 h, la mezcla de sangres había disminuido significativamente y casi desapareció a las 172 h. A diferencia, los ratones inyectados con el ^{125}I -2C9 de IgG1 de control no demostraron captación específica en xenoinjertos de RMS (Figura 1).

Cinética de la sangre

La eliminación de la sangre promedio en grupos de 5 ratones con y sin xenoinjertos de RMS inyectados con ^{125}I -8H9 se representa en la Figura 2. La actividad de la sangre de ^{125}I -8H9 a 24 h fue el 14,3% y el 17,3% de dosis inyectada por g (% de DI/g), respectivamente, y cayó al 3,3% y 5,3% de DI/g, respectivamente, a las 172 h. La semivida β de ^{125}I -8H9 fue 70,9 h.

Biodistribución

La Tabla 2 hace una lista de la biodistribución de 4,44 MBq de ^{125}I -8H9 en tres grupos de ratones con xenoinjertos de RMS estudiados a 24, 48 y 172 h, respectivamente. El efecto de la mezcla de sangres se observó a 24 h, que había disminuido a las 48 h y casi había disminuido completamente a las 172 h después de la inyección. No hubo actividad significativa en órganos normales, excepto la sangre a 172 h. La captación tumoral promedio fue $11,5 \pm 3,9$, $15,1 \pm 3,7$ y $5,4 \pm 1,2\%$ de dosis inyectada por g a 24, 48 y 172 h, respectivamente. La relación de sangre con respecto a tumor fue 1,24, 0,71 y 0,59 a 24, 48 y 172 h, respectivamente. Las relaciones medias de tumor/tejido (Figura 3) aumentaron de 24 a 48 h y fueron óptimas a 172 h (para pulmón 4, riñón 7, hígado 8, bazo 11, fémur 15, músculo 20, cerebro 47). En ratones inyectados con 0,74 MBq de ^{125}I -8H9 hubo un aumento adicional en las relaciones de tumor:tejido marcadas particularmente a 172 h después de la inyección (para pulmón 6, riñón 8, hígado 12, bazo 14, fémur 21, músculo 28, cerebro 56) (Tabla 3). La Tabla 4 resume la biodistribución de ^{125}I -8H9 en comparación con ^{125}I -2C9 120 h después de la inyección. La captación tumoral promedio fue $7,3 \pm 0,9\%$ de dosis inyectada por gramo para ^{125}I -8H9 con respecto al $2,5 \pm 0,9\%$ para ^{125}I -2C9. Las relaciones de tumor con respecto a tejido (Figura 4) fueron <1 para casi todos los tejidos para ^{125}I -2C9, con respecto a 2,6-56,0 para ^{125}I -8H9.

Actividad antitumoral

Los ratones inyectados con 18,5 MBq de ^{131}I -8H9 mostraron una supresión significativa en el volumen tumoral (Figura 5). El volumen tumoral promedio había disminuido hasta $<50\%$ del volumen inicial 21 días después de la inyección. Ninguno de los tumores mostró ningún indicio de recrecimiento. A diferencia, en el grupo de control, ratones inyectados con 18,5 MBq de ^{131}I -3F8, un MoAb dirigido contra G_{D_2} que no reacciona con HTB82, hubo un crecimiento de tumor progresivo y rápido.

Toxicidad

No se notó pérdida significativo de peso en ratones inyectados con 4,44 MBq de ^{131}I -8H9 15 y 30 días después de la inyección (datos no mostrados). Los hemogramas completos y los estudios funcionales hepáticos no revelaron ninguna anomalía (Tabla 5). Las evaluaciones de las necropsias completas no revelaron ninguna lesión macroscópica ni histológica (datos no mostrados). En los grupos de ratones tratados con MoAb marcados con ^{131}I no hubo pérdida de peso significativa 21 días después de la dosis inicial para tanto los grupos de 3F8 como de 8H9 ($+11,7 \pm 8,8\%$ para el grupo de 3F8 y $-2 \pm 1,8\%$ para el grupo de 8H9). El aumento de peso en el grupo de control pudo atribuirse al aumento de la masa tumoral.

Discusión

Se han descrito pocos antígenos específicos de tumor que puedan ser elegidos como diana por MoAb para RMS (Tabla 1). La miogenina, una proteína reguladora miogénica específica para rabdomioblastos, es de localización nu-

clear (16) y, por tanto, no es susceptible para ser elegida como diana por MoAb. Similarmente, la familia MyoD de proteínas oncofetales se expresa en núcleos (17). Por el contrario, los antígenos expresados en la membrana celular, BW475 (18) y miosina (19), también se expresan en tejido neural y muscular normales, respectivamente. La forma fetal del receptor acetilcolínico, $\alpha 2\beta\gamma\delta$, una posible diana para la inmunoterapia basada en anticuerpos, aunque no está presente en la mayoría del tejido muscular normal, se expresa en músculos extraoculares, células mioides tímicas y en músculo esquelético desnervado (20). El bloqueo del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGFI), que participa en una ruta autocrina y el crecimiento de RMS por anticuerpos monoclonales murinos, ha demostrado que inhibe el crecimiento de xenoinjertos de RMS establecidos en ratones sin pelo (21). Sin embargo, los receptores de IGF se expresan ubicuamente en tejidos normales.

El MoAb 8H9 reconoce un único antígeno de la membrana celular que se expresa en una amplia gama de tumores sólidos pediátricos y adultos (15). Además, este novedoso antígeno tiene expresión limitada en tejidos normales. En particular, el músculo esquelético y los tejidos hematopoyéticos son negativos. De hecho, 8H9 se ha utilizado para purgar sarcoma de Ewing de sangre y médula ósea (26). En RMS, el antígeno de 8H9 se expresa en variantes tanto alveolares como embrionarias. El 96% (29/30) de RMS estudiados expresaron el antígeno de 8H9. La expresión en la mayoría de los casos fue fuerte y homogénea. Se ha mostrado que las líneas celulares de RMS que incluían la línea celular HTB82 expresan este antígeno en membranas celulares. Por tanto, tiene la posibilidad de utilizarse como diana tumoral en RMS.

El RMS es un tumor quimiosensible y radiosensible, pero en pacientes con enfermedad metastásica la ERM conduce frecuentemente a recaída y previene la cura. La inmunoterapia usando 8H9 radiomarcado y sin marcar puede proporcionar un valioso complemento en la erradicación de ERM. Una solución similar ha conducido a curas satisfactorias que se consiguen en neuroblastoma de alto riesgo (6). En este estudio, los inventores evaluaron la elección como diana *in vivo* de RMS por 8H9 radiomarcado. Los inventores han demostrado que el 8H9 radiomarcado puede usarse eficazmente en la radioinmunodetección y radioinmunoterapia de xenoinjertos de RMS en ratones. Los resultados de los inventores mostraron que 8H9 marcado con ^{125}I o ^{131}I conservó la inmunoreactividad después del radiomarcado. Se obtuvo una actividad específica relativamente alta de $> 370 \text{ MBq/mg}$ de ^{125}I sin pérdida de la inmunoreactividad. Por tanto, 8H9 tiene la posibilidad de marcarse con dosis relativamente grandes de radioisótopos de yodo para soluciones de radioinmunoterapia.

Los resultados de obtención de imágenes de los inventores muestran que 8H9 puede unirse específicamente y selectivamente a RMS humanos xenoinjertados en ratones sin pelo. La captación en xenoinjertos podría detectarse ya 4 h después de la inyección. Se demostró una excelente selectividad para tumor con respecto al tejido normal. No hubo captación focal en ningún órgano normal incluyendo tejidos reticuloendoteliales. Esto está de acuerdo con la distribución específica del antígeno reconocido por 8H9 como se demuestra por la inmunohistoquímica en tejidos humanos y tumores (15). La especificidad de unión de 8H9 se demostró comparando la unión de ^{125}I -8H9 con la de ^{125}I -2C9. Como control negativo se usó 2C9, un MoAb IgG1 específico para citoqueratina 8, un antígeno no expresado por la línea celular de RMS HTB82. Como era de esperar, el 2C9 radiomarcado continuó en la circulación sanguínea y no mostró unión específica a xenoinjertos de RMS con relaciones de tumor:tejido de 0,1-1. En comparación, la dosis de radiación al tumor con respecto a los tejidos normales para ^{125}I -8H9 osciló de 2,6 a 25,3 veces. La especificidad de ^{125}I -8H9 también se demostró *in vitro* estudiando la unión de ^{125}I -8H9 a la línea celular negativa para 8H9 HTB119 en comparación con la línea positiva para 8H9 HTB82. La máxima unión de ^{125}I -2H9 fue el 83% en comparación con el 9% para HTB119, que indica que la unión de ^{125}I -8H9 era específica de antígeno.

Los estudios de biodistribución proveyeron a los inventores de datos preclínicos en consideración a un posible uso de 8H9 en ensayos humanos. La semivida β de una dosis única de 4,4 MBq de ^{125}I -8H9 fue 70,9 h. En general hubo un excelente diferencial de dosis de radiación entre RMS y tejidos normales. Las relaciones óptimas de tumor con respecto a no tumor se alcanzaron 172 h después de la inyección intravenosa de 8H9. Las relaciones de sangre:tumor fueron relativamente altas a las 24 h, indicativo de mezcla de sangres. La mezcla de sangres disminuyó 48 h después de la inyección y se redujo todavía mucho más a las 172 h. La probable captación por células del sistema reticuloendotelial produjo niveles relativamente altos para el hígado y el bazo en las primeras 24 h. Hubo un aumento de la captación en los tumores a las 48 h en comparación con las 24 h, sugiriendo otra elección como diana selectiva de 8H9 entre 24 y 48 h. La persistencia de ^{125}I -8H9 en la sangre durante las primeras 48 h de administración implica que no hay neutralización apreciable de anticuerpos por el antígeno de 8H9 en circulación. Cuando dosis inferiores de ^{125}I -8H9 para la obtención de imágenes (0,74 MBq en comparación con 4,44 MBq), las relaciones tumor:no tumor mejoraron, consecuente con la reducción de mezcla de sangres (Tabla 4). La persistencia de la unión de ^{125}I -8H9 a tumor implica que el antígeno de 8H9 no está inmunomodulado por la célula después de la unión del anticuerpo. Se demostraron hallazgos similares *in vitro*, en los que la unión antígeno-anticuerpo en la superficie celular como se detectaron por inmunofluorescencia persistieron $> 60 \text{ h}$ (15). Esta persistencia debería permitir una administración estacionaria de radiación a células tumorales por 8H9 radiomarcado. A dosis de 6,66 MBq/m² no hubo toxicidades de órganos clínicas (pesos corporales), químicas (hemograma completo y pruebas funcionales hepáticas) o macroscópicas o histológicas en las necropsias.

En un esfuerzo por desarrollar sistemas para estudiar reacciones antígeno-anticuerpo en espera de la identificación definitiva del antígeno de proteína de 58 kDa glicosilado reconocido por 8H9, los inventores usaron MoAb antiidiotípicos para 8H9 para servir de antígenos sustitutos. Éstos han permitido a los inventores estudiar la unión de 8H9 radiomarcado (radioinmunoensayo) y sin marcar (ELISA) *in vitro*. Los datos de los inventores indican que hubo una buena correlación entre la unión de ^{125}I -8H9 a anticuerpos antiidiotípicos para 8H9 y a antígeno nativo en sedimentos celulares.

El efecto radioinmunoterapéutico observado de ^{131}I -8H9 fue notable, con una reducción de >50% en el volumen tumoral de xenoinjertos de RMS bien establecidos que se consigue con una dosis de 18,5 MBq de ^{131}I -8H9 sin ningún efecto adverso. La naturaleza específica de antígeno de esta respuesta se confirmó cuando los xenoinjertos de RMS tratados con dosis equivalentes de anticuerpo no específico demostraron crecimiento tumoral no disminuido. Por tanto, el 8H9 radiomarcado puede tener una posible función clínica en la terapia de RMS.

Dada la amplia reactividad del MoAb 8H9 con tumores sólidos humanos que incluyen sarcomas, neuroblastoma y tumores cerebrales, estos estudios proporcionan la prueba del principio para explorar estrategias de elección de diana basadas en anticuerpos dirigidas a este antígeno.

Referencias

Crist W, Gehan E A, Ragab A H, Dickman P S, Donaldson S S, Fryer C, Hammond D, Hays D M, Herrmann J y Heyn R. The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study *J Clin Oncol* 13:610-30, 1995.

Maurer H M, Gehan E A, Beltangady M, Crist W, Dickman P S, Donaldson S S, Fryer C, Hammond D, Hays D M y Herrmann J. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-II. *Cancer* 71:1904-22, 1993.

Okamura J, Sutow W W y Moon T E. Prognosis in children with metastatic rhabdomyosarcoma. *Med Pediatr Oncol* 3:243-51, 1977.

Weigel B J, Breitfeld P P, Hawkins D, Crist W M y Baker K S. Role of high-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell rescue in the treatment of metastatic or recurrent rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 23:272-276, 2001.

Ruymann F B y Grovas A C. Progress in the diagnosis and treatment of rhabdomyosarcoma and related soft tissue sarcomas. *Cancer Invest* 18:223-241, 2000.

Cheung N K, Kushner B H, Cheung I Y, Kramer K, Canete A, Gerald W, Bonilla M A, Finn R, Yeh S J y Larson S M. Anti GD2 antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. *J. Clin. Oncol.*, 16: 3053-60, 1998.

Cheung N K, Kushner B H, Yeh S D J y Larson S M. 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage 4 neuroblastoma: a phase II study. *Int. J. Oncol* 12: 1299-306, 1998.

Cheung N K, Neely J E, Landmeier B, Nelson D y Miraldi F. Targeting of ganglioside GD2 monoclonal antibody to neuroblastoma *J Nuc Med* 28:1577-83, 1987.

Cheung N K, Landmeier B, Neely J, Nelson A D, Abramowsky C, Ellery S, Adams R B y Miraldi F. Complete tumor ablation with iodine 131-radiolabeled disialoganglioside GD2-specific monoclonal antibody against human neuroblastoma xenografted in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 77:739-745, 1986.

Yeh S D, Larson S M, Burch L, Kushner B H, LaQuaglia M, Finn R y Cheung N K. Radioimmunodetection of neuroblastoma with iodine-131-3F8: correlation with biopsy, iodine-131-metaiodobenzylguanidine and standard diagnostic modalities. *J. Nucl. Med.* 32: 769-76, 1991.

Kramer K, Cheung N K, Humm J L, Dantis E, Finn R, Yeh S J, Antunes N L, Dunkel I J, Souwedayne M y Larson S M. Targeted radioimmunotherapy for leptomeningeal cancer using (131)I-3F8. *Med Pediatr Oncol* 35:716-8, 2000.

Thomson B, Hawkins D, Felgenhauer J y Radich J. RT-PCR evaluation of peripheral blood, bone marrow and peripheral blood stem cells in children and adolescents undergoing VACIME chemotherapy for Ewing's sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma. *Bone Marrow Transplant* 24:527-33, 1999.

Athale U H, Shurtleff S A, Jenkins J J, Poquette C A, Tan M, Downing J R y Pappo A S. Use of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Diagnosis and Staging of Alveolar Rhabdomyosarcoma, Ewing Sarcoma Family of Tumors, and Desmoplastic Small Round Cell Tumor. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 23(2):99-104, 2001.

Mackall C, Berzofsky J y Helman L J. Targeting tumor specific translocations in sarcomas in pediatric patients for immunotherapy. *Clin Orthop.* 373:25-31, 2000.

Modak S, Kramer K, Gultekin S H, Guo H F y Cheung N K. Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors. *Cancer Res.* 61:4048-54, 2001.

Kumar S, Perlaman, E, Harris C A, Raffeld M y Tsokos M. Myogenin is a specific marker for rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical study in paraffin embedded tissues. *Mod Pathol* 13: 988-93, 2000.

Wang N. P., Marx J., McNutt M. A., Rutledge J. C. y Gown A. M., Expression of myogenic regulatory proteins (myogenin and MyoD1) in small blue round cell tumors of childhood. *Am J Pathol* 147: 1799-1810, 1995.

Fujisawa T, Xu Z. J., Reynolds C. P, Schultz G., Bosslet I. V., and. Seeger R. C., A monoclonal antibody with selective immunoreactivity for neuroblastoma and rhabdomyosarcoma. (abs) *Proc. AACR* 30: 345, 1989.

**Gruchala A, Niezabitowski A, Wasilewska A, Sikora K, Rys J, Szklarski W, Jaszcz A, Lackowska B y Her-
man K.** Rhabdomyosarcoma. Morphologic, immunohistochemical, and DNA study. *Gen Diagn Pathol* 1142:175-84, 1997.

Gattenloehner S, Vincent A, Leuschner I, Tzartos S, Muller-Hermelink H K, Kirchner T y Marx A. The fetal form of the acetylcholine receptor distinguishes rhabdomyosarcomas from other childhood tumors. *Am J Pathol*. 152:437-44, 1998.

Kalebic T, Tsokos M, Helman L J. *In vivo* treatment with antibody against IGF-1 receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34cdc2. *Cancer Res* 54:5531-4, 1994.

Truong L D, Rangdaeng S, Cagle P, Ro J Y, Hawkins H, Font R L. The diagnostic utility of desmin. A study of 584 cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 93:305-14, 1990.

Qualman S J, Coffin C M, Newton W A, Hojo H, Triche TJ , Parham D M y Crist W M. Intergroup Rhabdomyosarcoma Study: update for pathologists. *Pediatr Dev Pathol* 1:550-61, 1998.

Garin-Chesa P., Fellingner E. J., Huvos A. G., Beresford H. R., Melamed M. R., Triche T. J. y Rettig W. J., Immunohistochemical analysis of neural cell adhesion molecules. Differential expression in small round cell tumors of childhood and adolescence. *Am. J. Pathol.* 139: 275-286, 1991.

Strother D R, Parham D M y Houghton P J. Expression of the 5.1 H11 antigen, a fetal muscle surface antigen, in normal and neoplastic tissue. *Arch Pathol Lab Med* 114:593-596, 1990.

Merino M E, Navid F, Christensen B L, Toretsky J A, Helman L J, Cheung N K y Mackall C L. Immunomagnetic purging of ewing's sarcoma from blood and bone marrow: quantitation by real-time polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 19:3649-3659, 2001.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, en el que la región determinante de la complementariedad es NYDIN para CDR1, WIFPGDGSTQYNE para CDR2, QTTATWFAY para CDR3 para la cadena pesada y RASQSISDYLH para la CDR1, YASQSIS para CDR2, QNGHSFPLT para CDR3 para la cadena ligera.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que las secuencias que no se corresponden con la región determinante de la complementariedad son de origen humano.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, que incluye secuencias como se exponen en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo está marcado.

5. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo es un scFv aislado.

6. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo es un scFv-Fc aislado.

7. Un anticuerpo que puede inhibir competitivamente la unión de anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o que puede inhibir competitivamente la unión de un fragmento scFv de la reivindicación 5 ó 6.

8. Una composición que comprende el anticuerpo o el anticuerpo marcado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un fragmento scFv del mismo de la reivindicación 5 ó 6 y un vehículo adecuado.

9. Una composición de la reivindicación 8, en la que el anticuerpo es una construcción de fusión de anticuerpos.

10. La composición de la reivindicación 8, en la que el scFv o un scFv-Fc está directamente o indirectamente acoplado a un agente citotóxico.

11. La composición de la reivindicación 10, en la que el agente citotóxico es un radioisótopo.

12. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o un fragmento scFv del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

13. Un vector que comprende las moléculas de ácidos nucleicos de la reivindicación 12.

14. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 13.

15. Una célula o un liposoma que comprende un anticuerpo o un anticuerpo marcado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un fragmento scFv según la reivindicación 5 ó 6.

16. Una célula o liposoma modificado por scFv según la reivindicación 5.

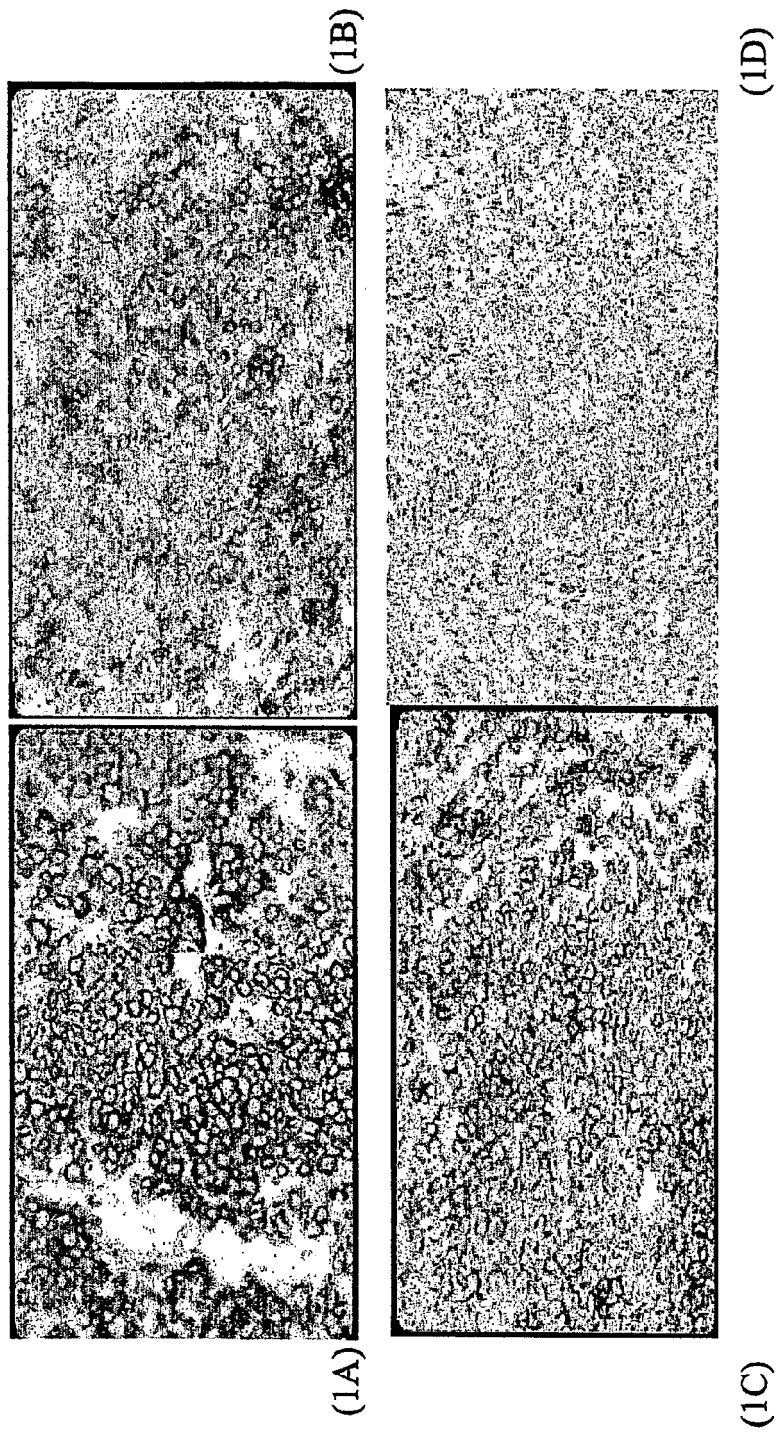
17. Una célula de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 que es un eritrocito.

18. El anticuerpo monoclonal, el anticuerpo monoclonal marcado o el fragmento scFv según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 como terapia antitumoral.

19. Uso de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal marcado o un fragmento scFv del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para la preparación de un medicamento para destruir y/o reducir células tumorales y/o inhibir el crecimiento del tumor.

20. Uso del anticuerpo monoclonal o un fragmento scFv según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para la preparación de un medicamento para obtener imágenes de células tumorales que portan el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal o el scFv están marcados.

FIGURA 1



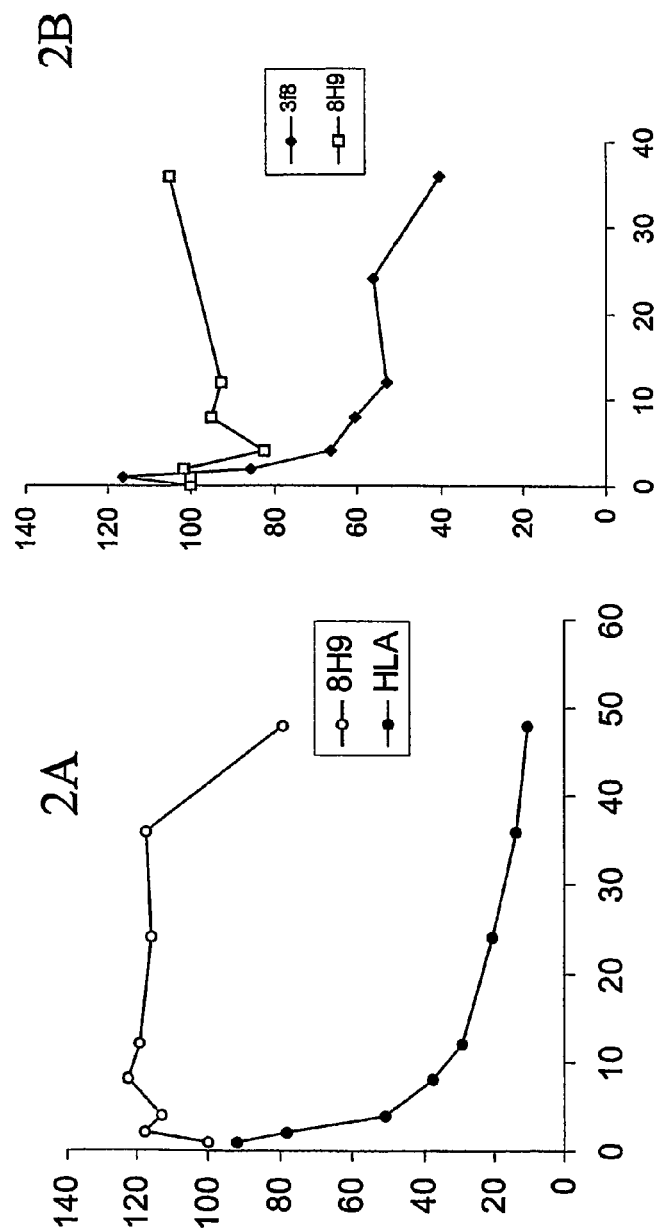


FIGURA 2

FIGURA 3

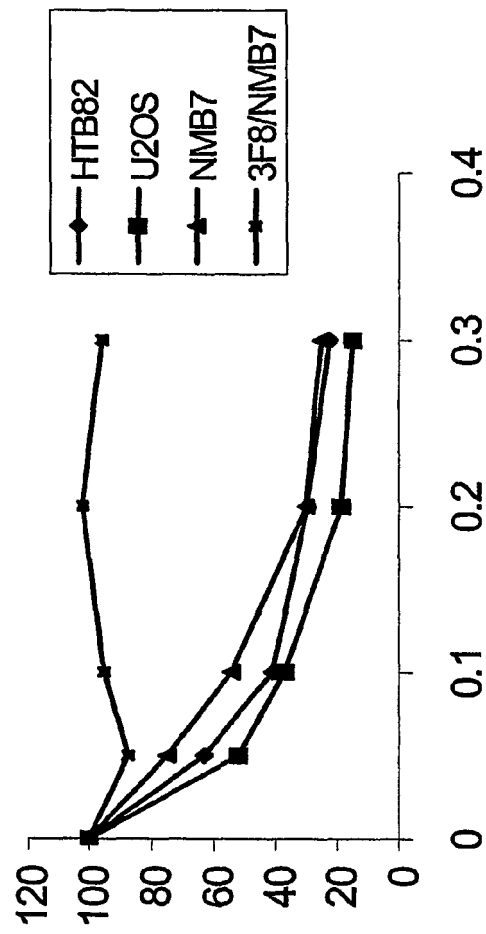


FIGURA 4

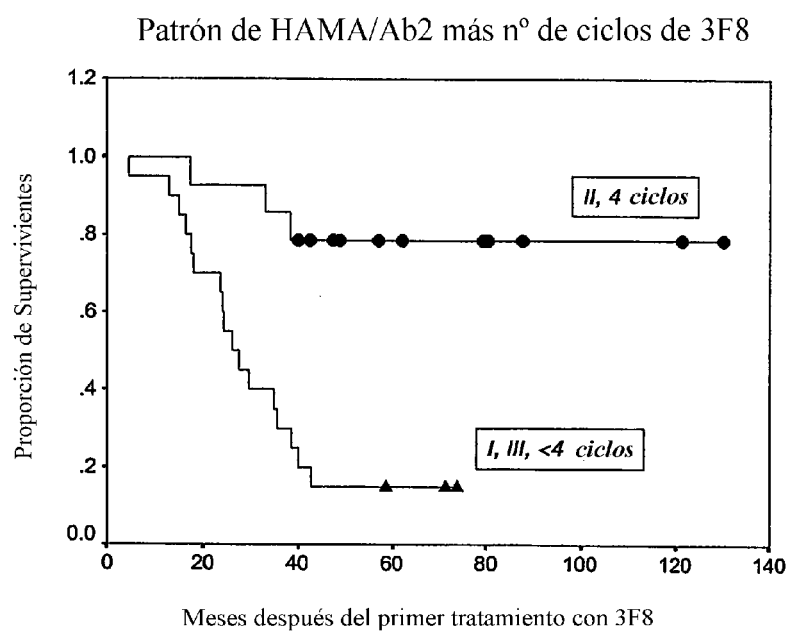


FIGURA 5

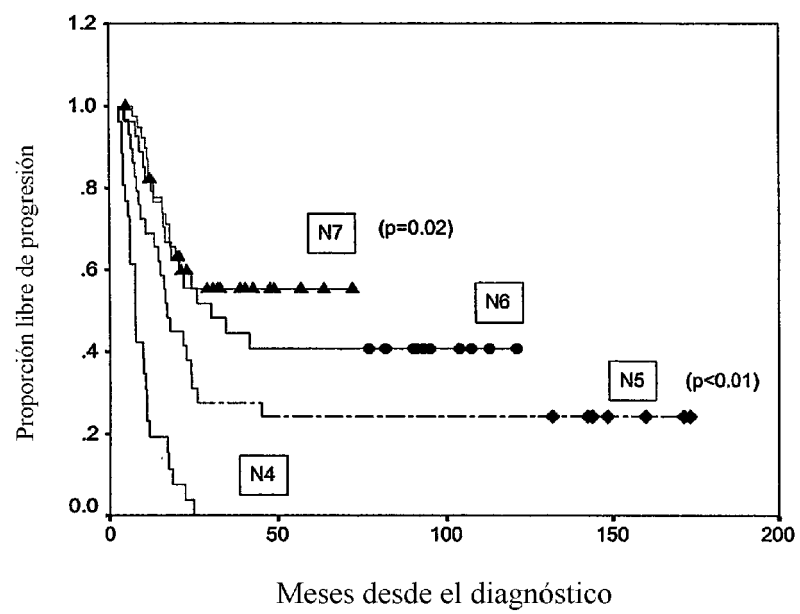


FIGURA 6

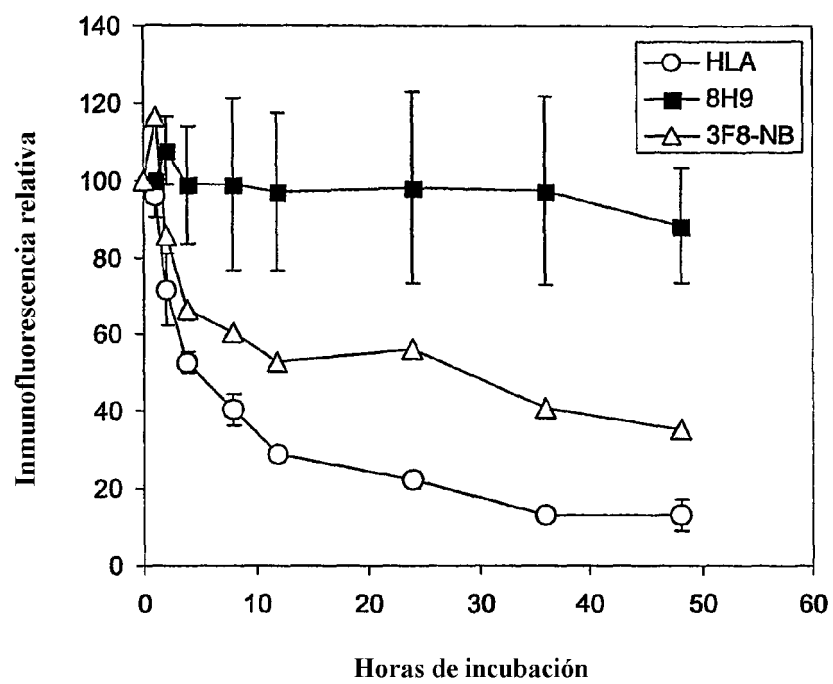


FIGURA 7

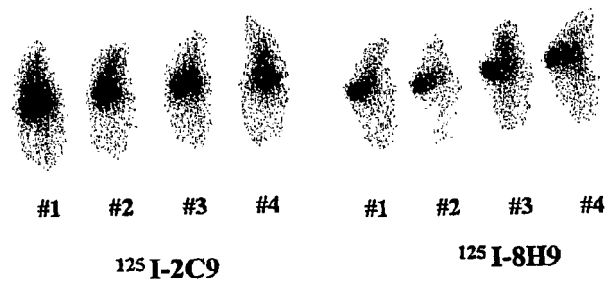


FIGURA 8

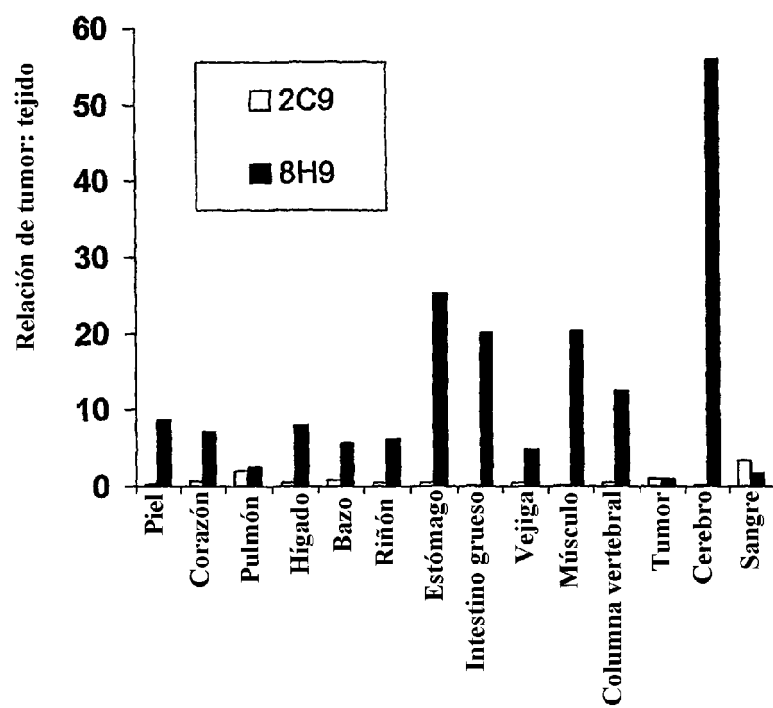


FIGURA 9

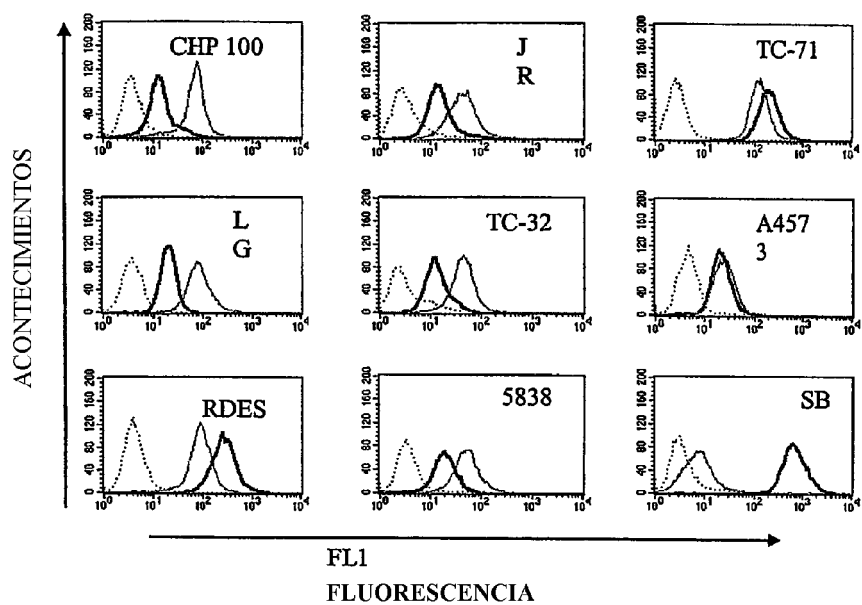


FIGURA 10

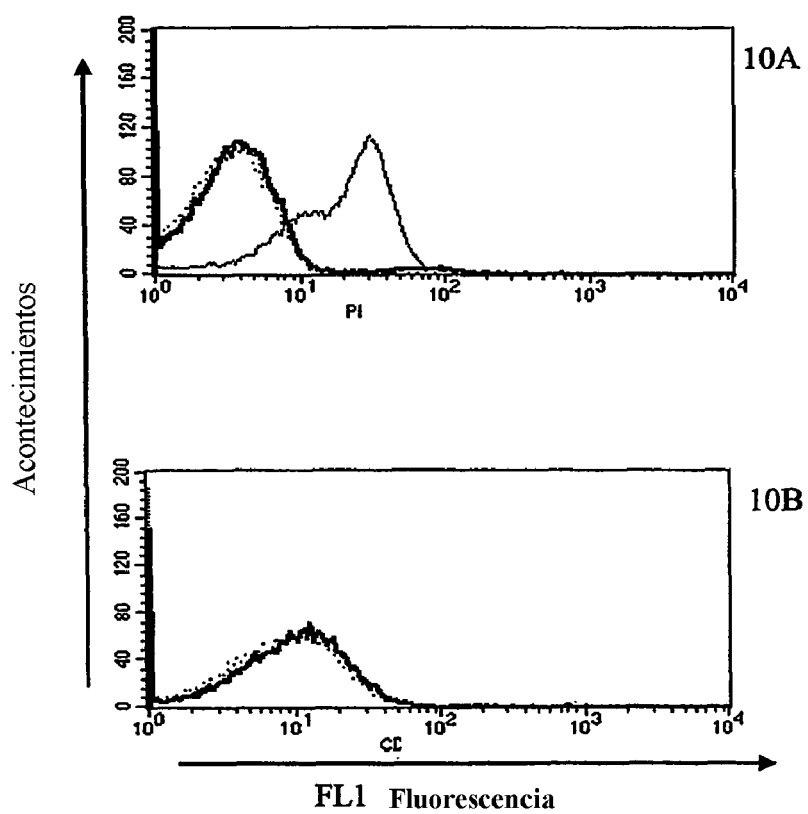


FIGURA 11

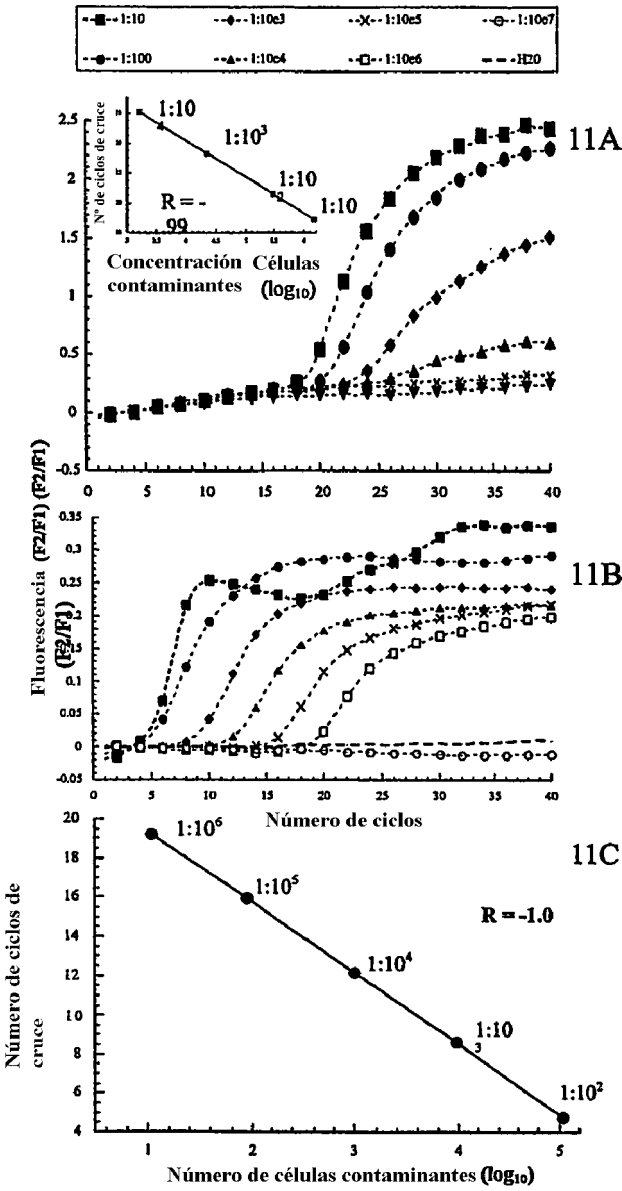


FIGURA 12

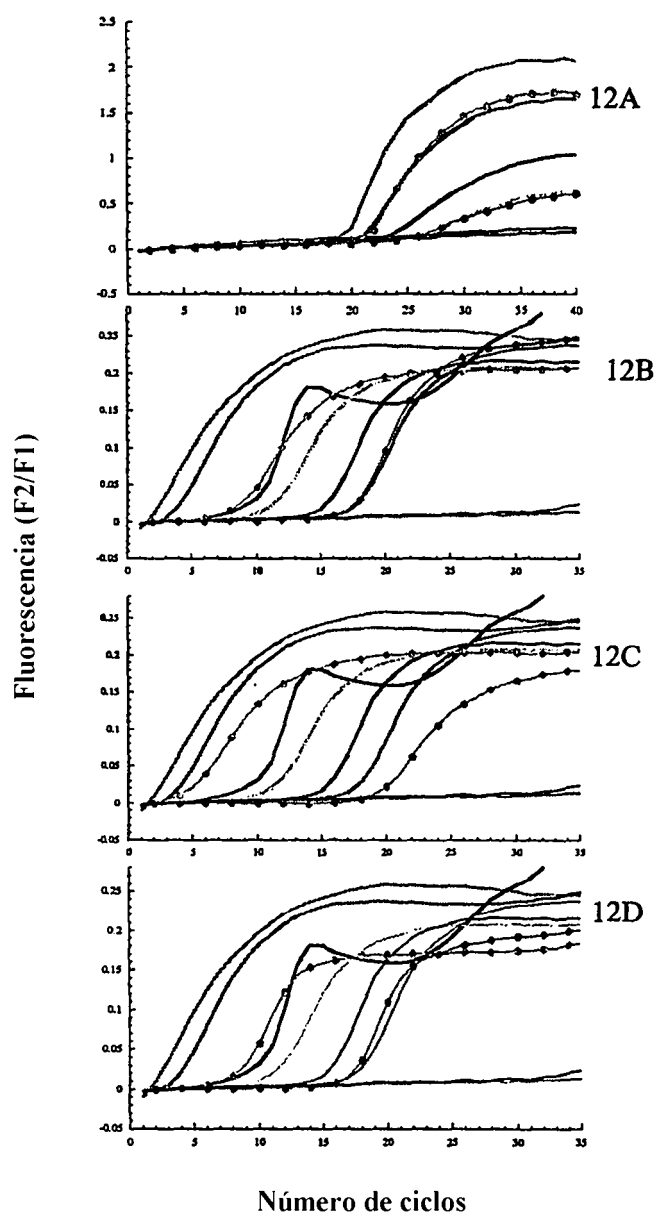


FIGURA 13

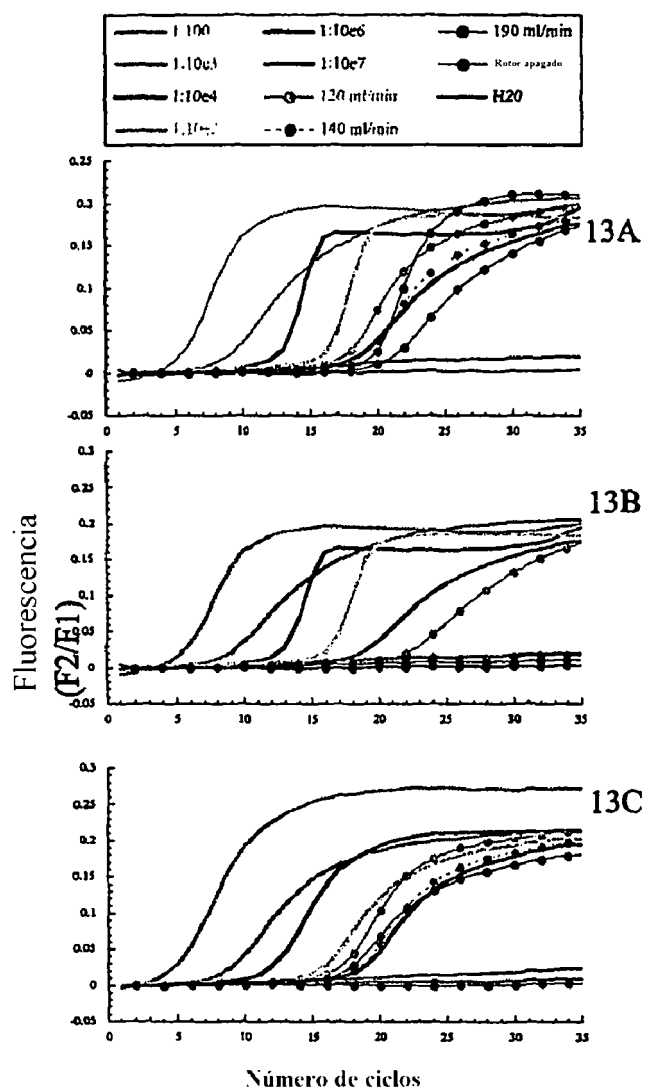


FIGURA 14

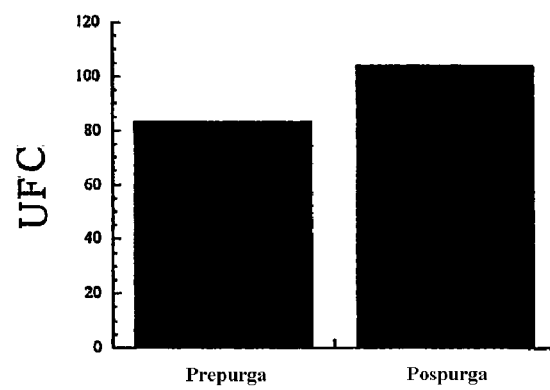
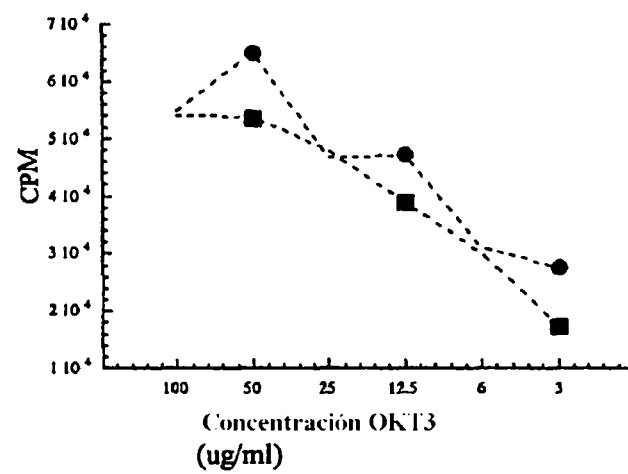


FIGURA 15



ES 2 357 425 T3

FIGURA 16



FIGURA 17

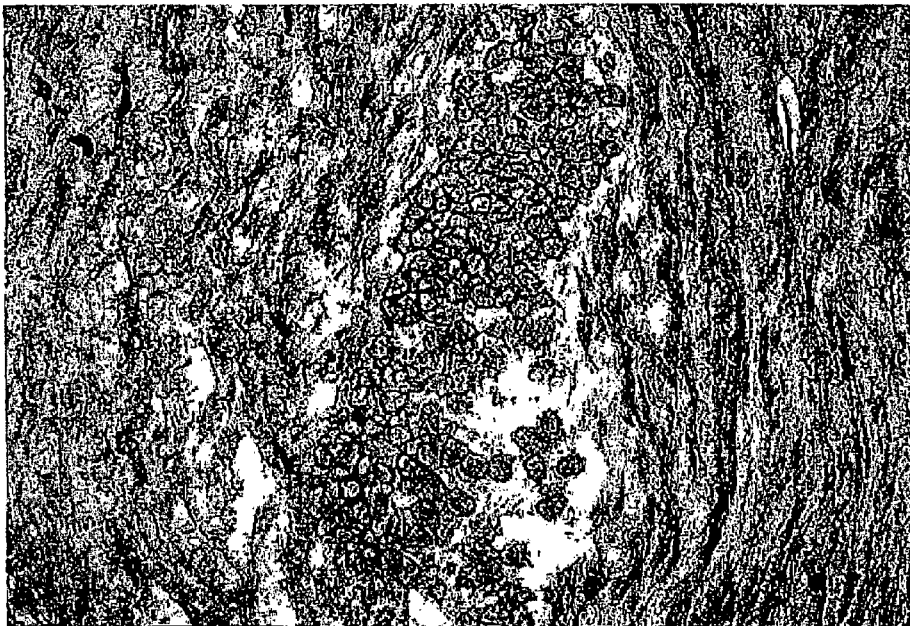


FIGURA 18A

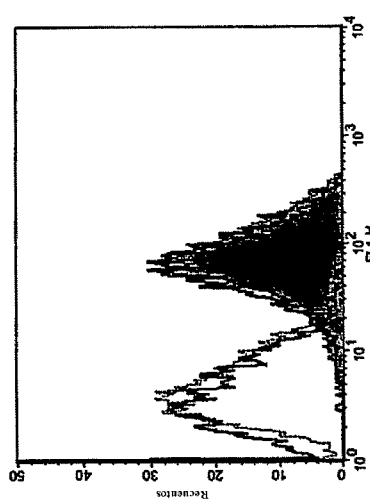


FIGURA 18B

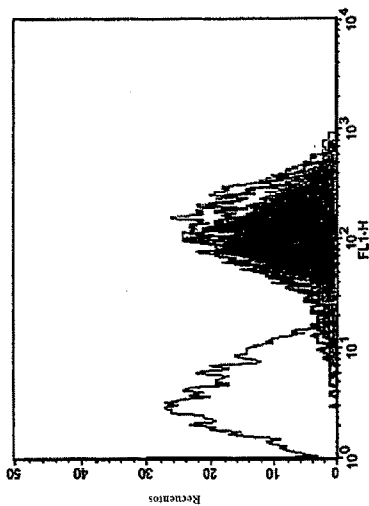


FIGURA 18C

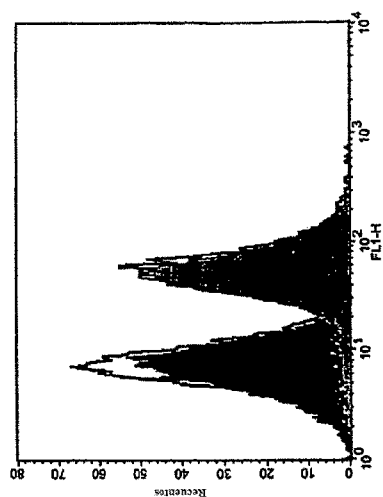
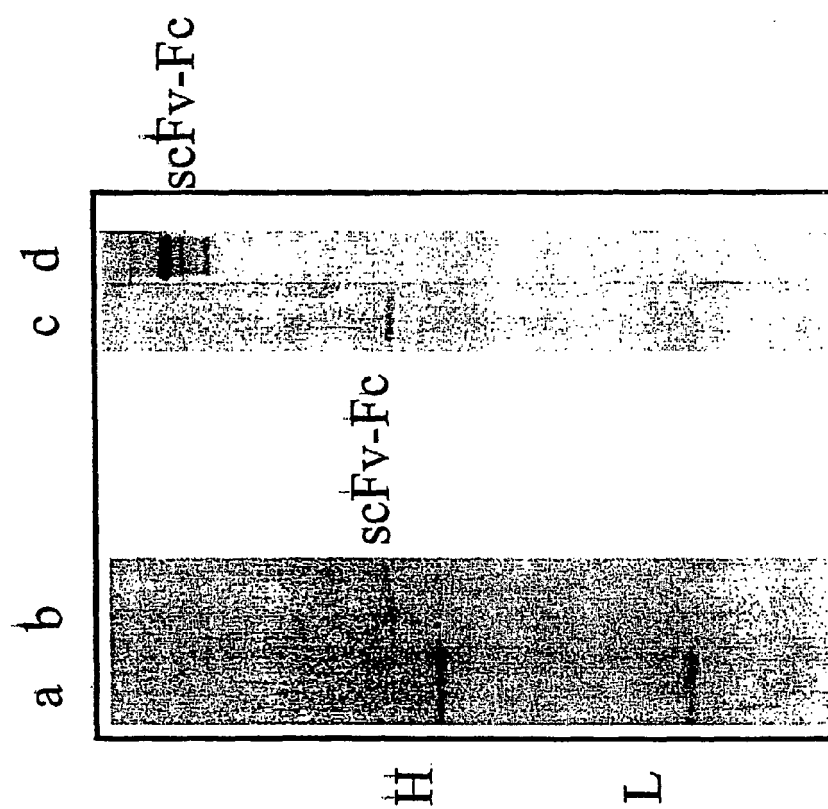


Figura 19



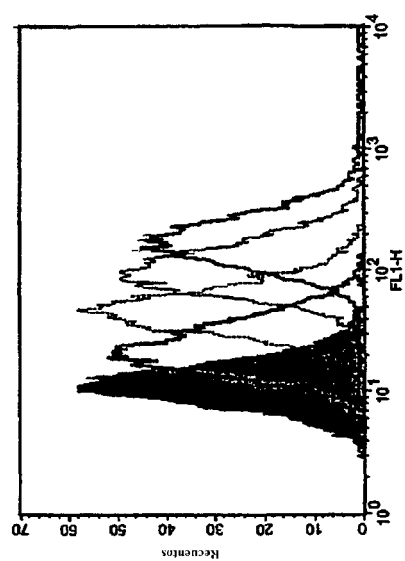


FIGURA 20A

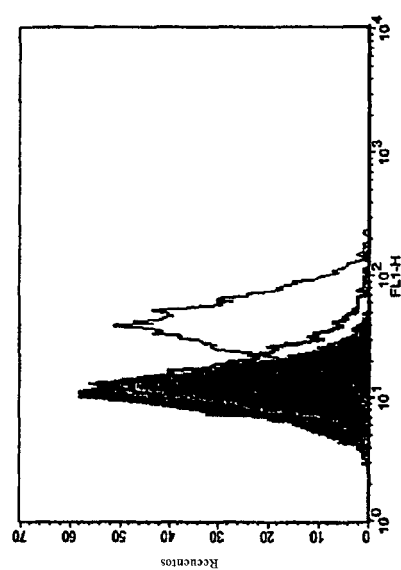


FIGURA 20B

Figura 21

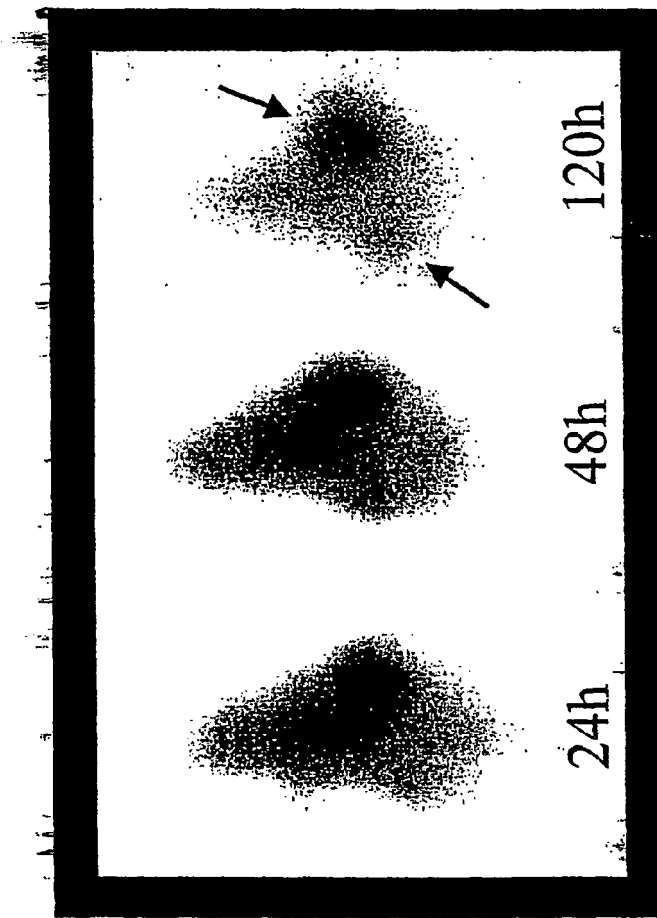


FIGURA 22

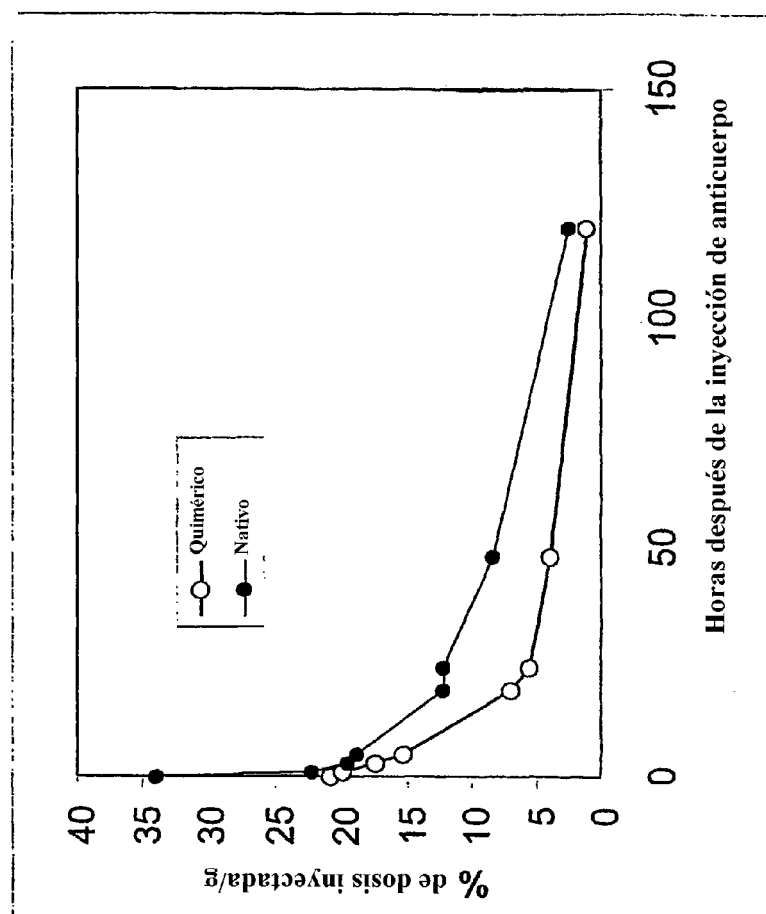


FIGURA 23

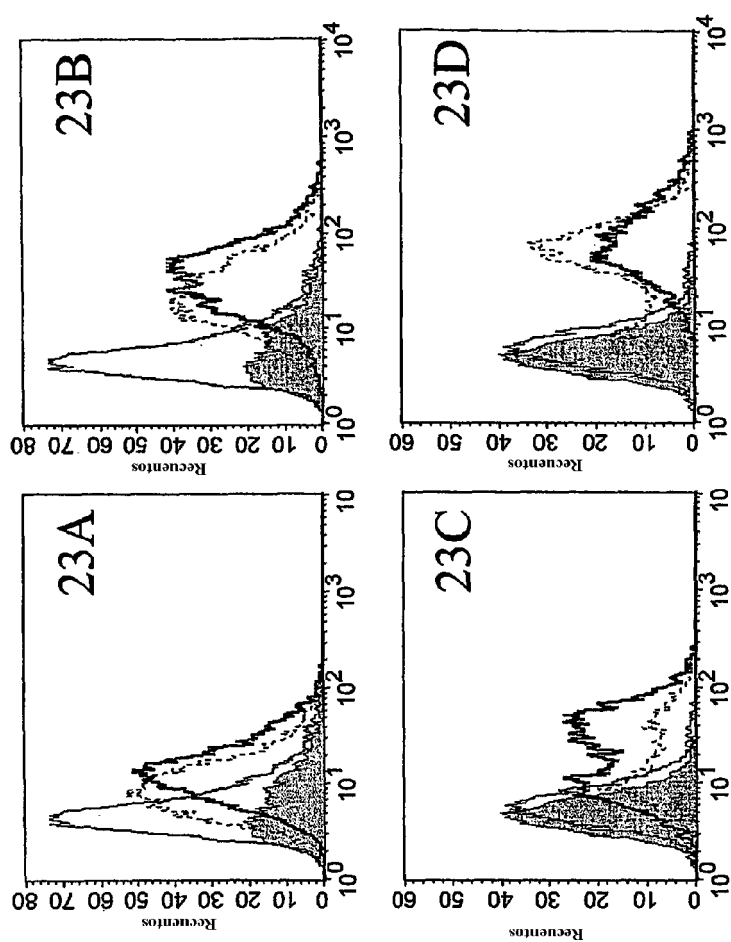


FIGURA 24

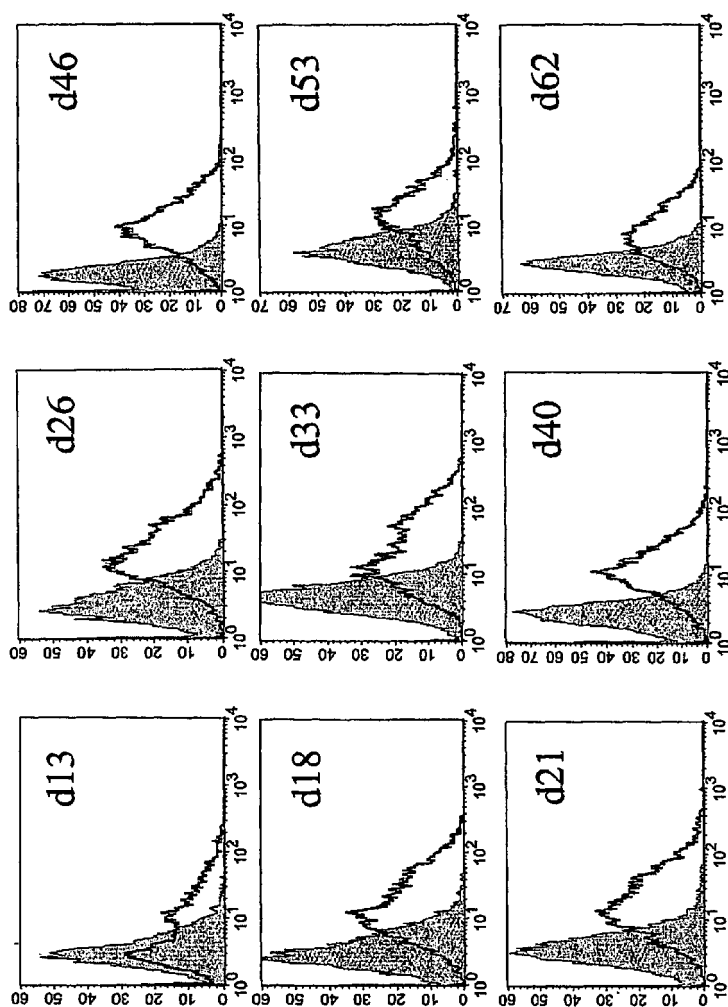


FIGURA 25

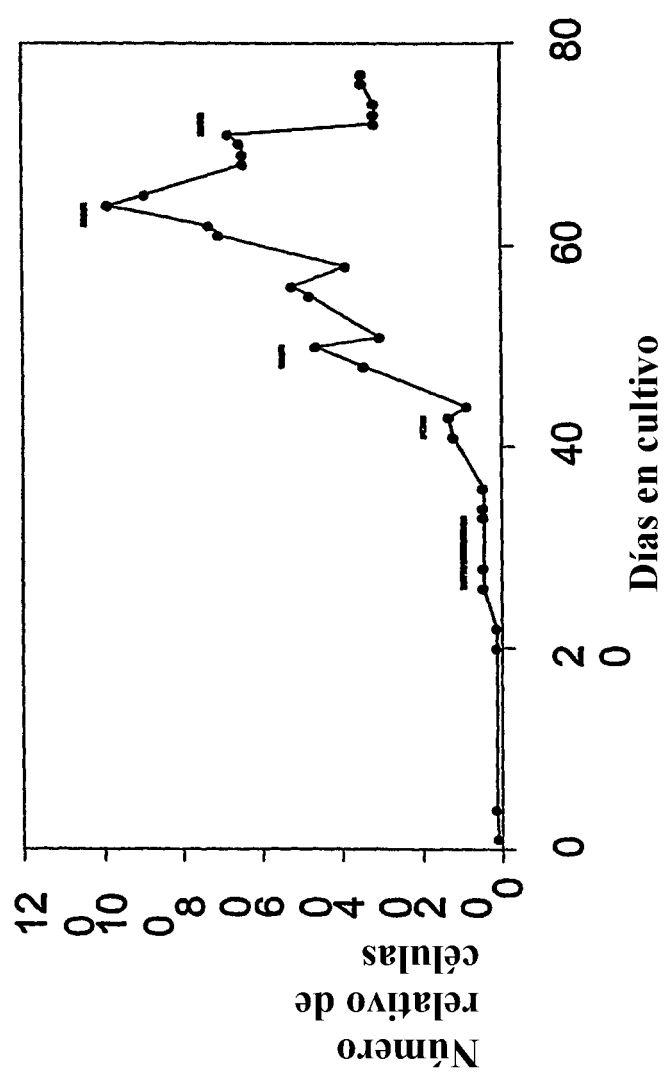


FIGURA 26

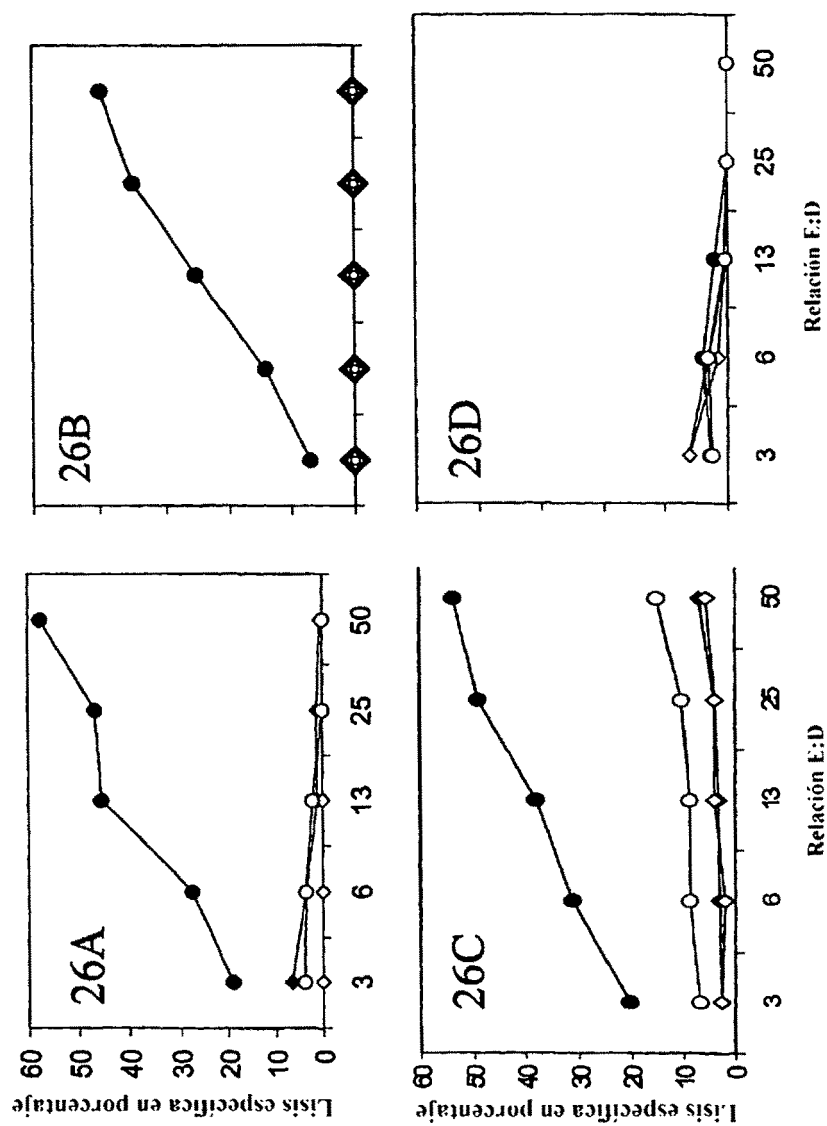


FIGURA 27

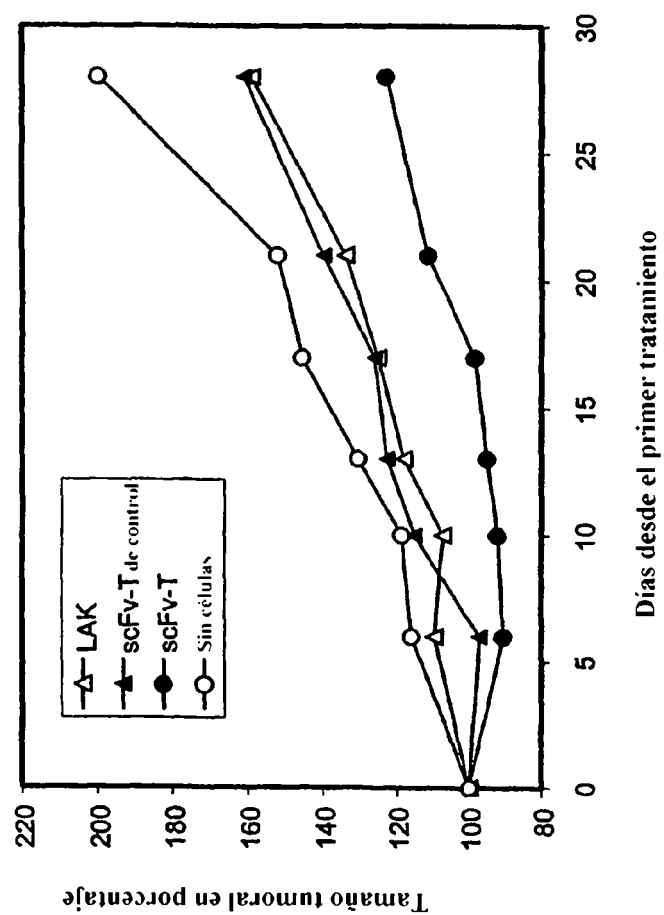


FIGURA 28

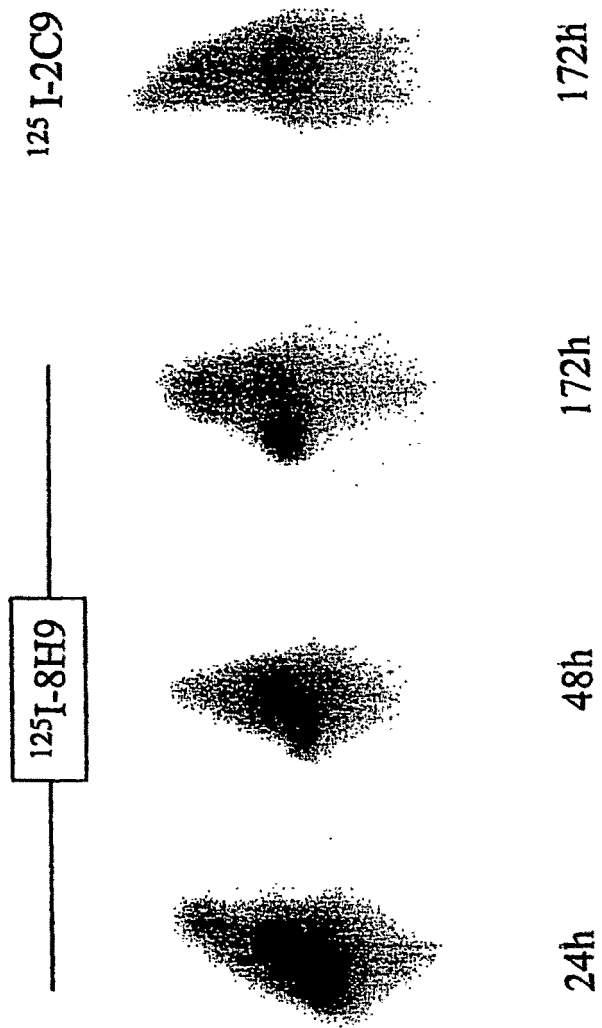


FIGURA 29

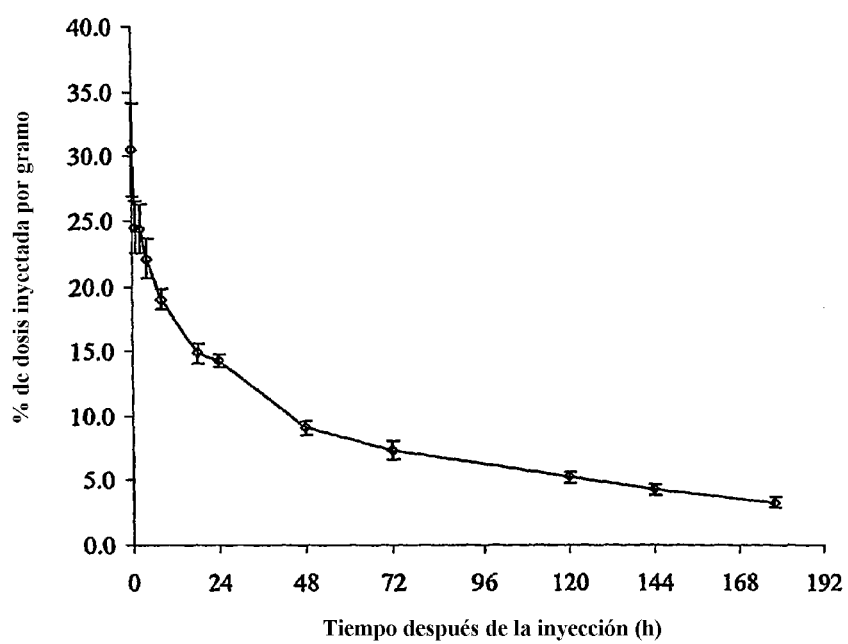


FIGURA 30

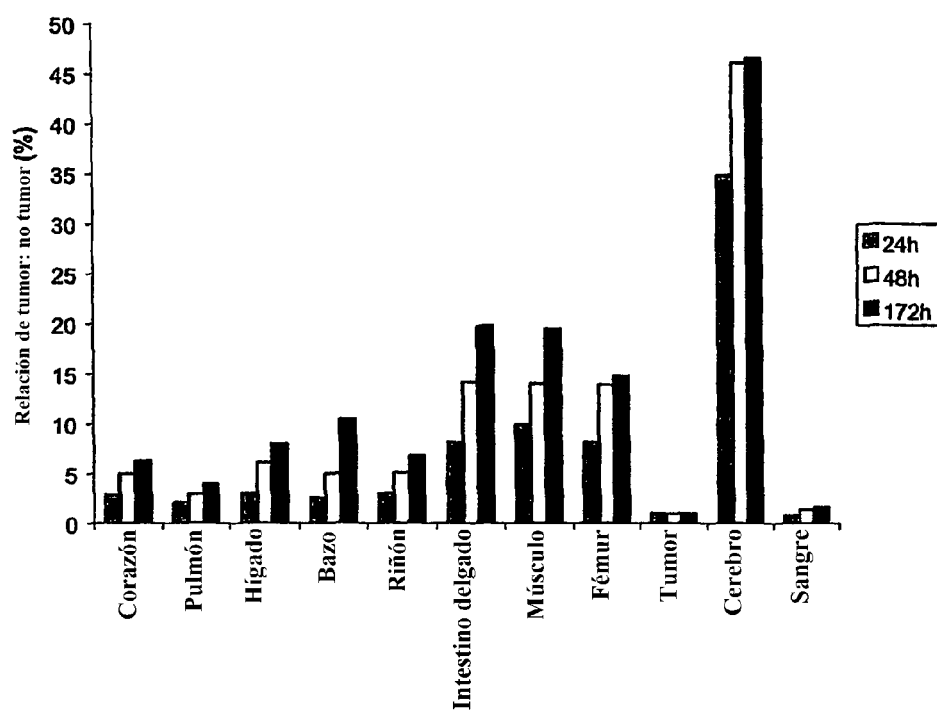


FIGURA 31

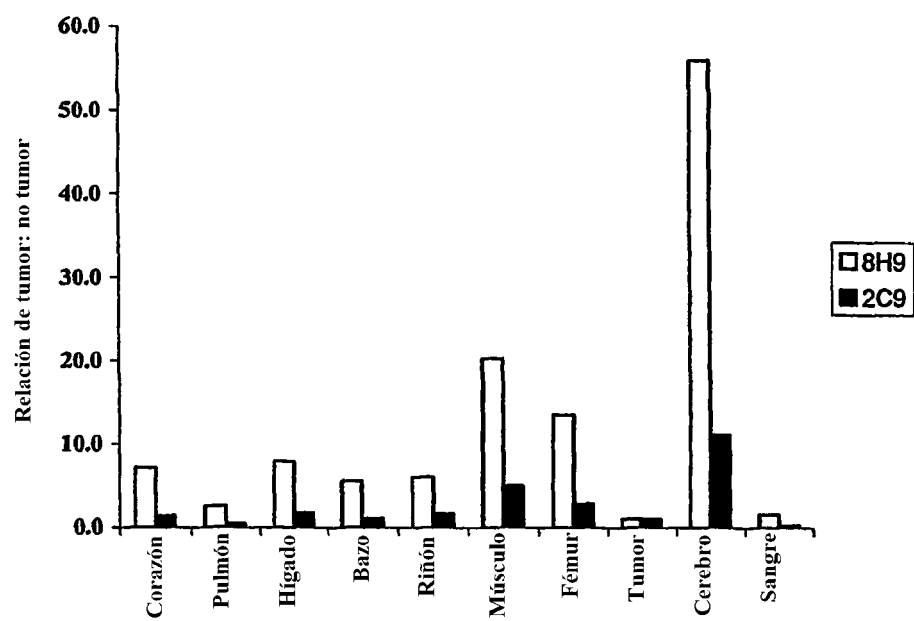


FIGURA
32

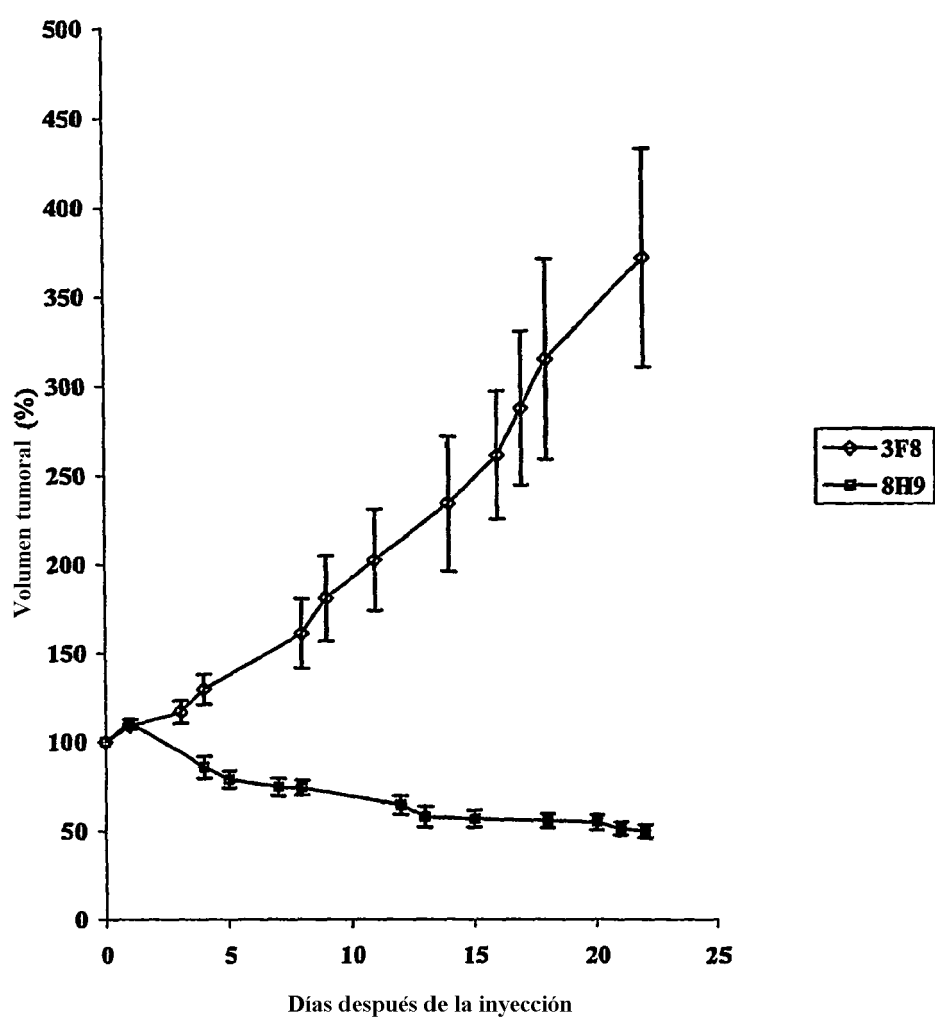


Figura 33: Secuencia de scFv de 8H9

1 Q V K L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T
 CAGGTCAA CTGACGAG TCTGGGCT GAACTGTA AAGCTGGG GCTTCAGT GAATGTCC TGTAGGCT TCTGGCTAC ACCTTCACA
 GTCCAGTTT GAGCTGGT AGACCCGA CTTGACCAT TTCCGACC CCAAGTCAC TTACACAG ACCTTCGA AGACCGATG TGGAGTGT

91 N Y D I N W V R Q R P E Q G L E W I F P G D G S T Q Y
 AACTATGAT ATAAAGTGG GTGAGGCG AGGCTGGA CAGGACTT GAGTGAAT GATTCCTGGA GATTCGAGT ACTCATAG
 TTGATGTA ATATTTG ACC CACTCCCTC TCAGGACTT GTCCCTGAA CTCACCTAA CCTAGCTAA AAGGAGCT ACTACATCA TTAGTTATG

181 N E K F K G K A T L T T D T S S S T A Y M Q L S R L T S E D
 EATGEGAG TTCAGGAG AGGCCACA CTGACTACA GACACATCC TCAGACACA GCTTACATG CAGCTCAG CAGCTCACA TCTGAGGAC
 ATAGTGTTC AAGTTCCCG TTCCGTTGT GACTGATGT CAGTGTAG AGTCTGAT CAGTGTATG TCCAGTGTG TCCAGTGTG AGACTCTG

271 S A V Y F C A R Q T T A T W F A Y W G Q G T T V T V S S G G
 TCTGCTGC TATTCTGT GCAAGACG ACTAGGCT ACCGCTTTC GTTATGAG GGCACAGG ACCACGCTC ACCGCTCC TCAGGTGGA
 AGACACAG ATAAAGACA CATTCTGTC TGAATGCCA TGGACUAA TGAATGACC CCGTTCCG TGGTCCAG TGGCAGAGG AGTCCACCT

361 G G S G G G S G G G G S D I E L T Q S P T T L S V T P G D
 GGGGTCA GGGGAGT GGTCTGGC GTTGGGGA TGGACATC GAGCTCAT CAGTCTCA ACCACCTG TCTGTACT CCAAGAGAT
 CCGCTAAGT CCGCTTCA CCGAGACG CCAAGGCT AGCTGTAG CTGAGTGA GTGAGGAT TGGTGGAG AGACACTGA GGTCTCTA

451 R V S L S C R A S Q S I S D Y L H W Y Q Q K S H E S P R L L
 AAGTCTCT CTTCCTGC [REDACTED] TGG TACCAACA AATCACAAT GAGTCTCA AGCTTCTC
 TCTCAGGA GAGGGAG [REDACTED] ACC ATGTTCTT TTATGTA CTCAGGAT TCCAGAGG

541 I K Y A S Q S I S G I P S R F S G S G S D F T L S I N S
 ATCAA [REDACTED] GAGTCCC TCAGGCTC AGTGCAT GATCAGG TCAATTC ACTCTCAT ATCAGAT
 TAGTTT [REDACTED] CCTAGGG AGTCCAG TCACGTCA CCAAGTCA CCAAGTCA TAGTTCTA

631 V E P E D V G V Y Y C Q N G H S F P L T F G A G T K L E L K
 GTGAACTT GAGATGTT GAGTGTAT TACTGT [REDACTED] TTC GTTGTGG ACCAAGCTG GAGCTGAA
 CAGCTTGA CTCTACA CCTCACATA ATGACA [REDACTED] GAG CCAAGACC TGGTTCAG CTCGACTTT

721 Q A A
 CAGGCGCC GC
 GTCCGCGG CG

FIGURA 34:

Secuencia de ADNc de scFv de 8H9

CAGGTCAAACCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAATTGTCTGCA
AGGCTTCTGGCTACACCTTCACAACTATGATATAAACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGAACAGGGACT
TGAGTGGATTGGATGGATTTTCTGGAGATGGTAGTACTCAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAG
GCCACACTGACTACAGACACATCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGGCTGACATCTGAGG
ACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGACAGACTACGGCTACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCAGATGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACA
TCGAGCTCACTCAGTCTCCAACACCCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCTCTTCTCTGCAGG
GCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTACACTGGTACCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTC
TCATCAAATATGCTTCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCA
GATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTACTGTCAAAATGGTCA
CAGCTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACAGGCGGCCGC

Secuencia de aminoácidos de scFv de 8H9

QVKLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFITNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDSTQYNEKFKGKAT
LTTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTATWFAYWGQGTITVTVSSDGGGSGGGSGGGSDIELT
QSPITLSVTPGDRVSLSCRASQSSDYLHWYQKSHESPRLIKYASQSSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEP
EDVGVIYCCQNGHSFPLTFGAGTKLELQAA

scFv de 8H9 mutado con adherencia de tejido normal disminuida

QVKLQQSGAELVEPGASVKLSCKASGYTFITNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDSTQYNEKFKGKAT
LTTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTATWFAYWGQGTITVTVSSDGGGSGGGSGGGSDIELT
QSPITLSVTPGDQVSLSCRASQSSDYLHWYQKSHESPQLIKYASQSSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVE
PEDVGVIYCCQNGHSFPLTFGAGTELELQAA