

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 631**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07821118 .2**
96 Fecha de presentación: **10.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2076542**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.07.2009**

54

Título: **Utilización de anticuerpos monoclonales específicos de la forma O-acetilada del gangliósido GD2 en el tratamiento de determinados cánceres**

30

Prioridad:
10.10.2006 FR 0608881

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.12.2012

73

Titular/es:
**UNIVERSITÉ DE NANTES (100.0%)
1, QUAI DE TOURVILLE B. P. 13522
44035 NANTES CEDEX , FR**

72

Inventor/es:
**BIRKLE, STÉPHANE;
MUSSINI, JEAN-MARIE;
AUBRY, JACQUES;
BARBET, JACQUES;
CHATAL, JEAN-FRANÇOIS;
MEZAZIGH HAMI, ASSIA y
SUPIOT, STÉPHANE**

74

Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 631 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de anticuerpos monoclonales específicos de la forma O-acetilada del gangliósido GD2 en el tratamiento de determinados cánceres.

Campo de la invención

- 5 La presente invención pretende suministrar nuevos medios para la terapia de los cánceres en los que las células expresan la forma O-acetilada del gangliósido GD2. La presente divulgación también pretende suministrar nuevos medios para el diagnóstico de los cánceres en los que las células expresan la forma O-acetilada del gangliósido GD2. Estos medios incluyen esencialmente la utilización de anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de éstos que reconocen el GD2 O-acetilado y que no reconocen las células sanas y las fibras nerviosas del sistema nervioso periférico. Estos nuevos medios serán más específicos de las células cancerosas y reducirán la toxicidad de los tratamientos respecto a los anticuerpos y derivados utilizados anteriormente para tratar estos cánceres.

Técnica anterior

- 15 Las células tumorales poseen en su superficie un determinado número de determinantes antigénicos. Entre estos determinantes antigénicos, algunos son antígenos específicos del tumor. Estos antígenos tumorales se expresan principalmente incluso exclusivamente en la superficie de las células cancerosas.

Estos antígenos tumorales humanos inducen la producción, por el sistema inmunitario de especies diferentes como el ratón, de moléculas denominadas anticuerpos que tienen la particularidad de reconocer precisamente las moléculas de antígeno que originan su producción.

- 20 Este reconocimiento específico entre un anticuerpo monoclonal y su antígeno tumoral humano presenta un interés importante para la focalización inmune de los cánceres. En efecto, permite concentrar a nivel de los tejidos u órganos enfermos, los agentes de detección en un objetivo de diagnóstico o los agentes tóxicos en un objetivo de tratamiento de los tumores. Estos agentes de detección o tóxicos pueden ser compuestos químicos o biológicos, opcionalmente radiactivos, unidos artificialmente a los anticuerpos antes o después de su administración. Estos agentes pueden ser igualmente compuestos biológicos que están presentes naturalmente en el paciente (componentes del complemento, quimioquinas, citoquinas, células citotóxicas, por ejemplo linfocitos T o NK) reclutados frente a las células tumorales por los anticuerpos.

- 30 Los gangliósidos son constituyentes de la membrana celular y algunos de ellos se han caracterizado como antígenos tumorales. Se ha podido demostrar que el gangliósido GD2 está fuertemente expresado en los cánceres humanos de origen neuroectodérmico tales como principalmente los melanomas, glioblastomas, carcinomas pulmonares de células pequeñas y neuroblastomas. La lista de las patologías tumorales citadas aquí no es exhaustiva. Los retinoblastomas y los osteosarcomas expresan igualmente el gangliósido GD2. Determinados cánceres de ovario expresan igualmente el gangliósido GD2. El gangliósido GD2 es un glicolípido ácido formado por una ceramida asociada a un oligosacárido cuya secuencia es glucosa galactosa N-acetil-galactosamina. A la molécula de galactosa se encuentran unidas dos moléculas de ácido siálico. El ácido siálico terminal puede estar modificado por la adición de un grupo O-acetilo para formar el GD2 O-acetilado. Mediante anticuerpos específicos de GD2 que reconocen igualmente su forma O-acetilada, se ha podido mostrar que determinados tipos de cánceres, principalmente los tumores de origen neuroectodérmico expresan GD2 y su forma O-acetilada, el GD2 O-acetilado, en proporción variable.

- 40 Se han descrito varios anticuerpos monoclonales anti-GD2 producidos en el ratón. La utilización terapéutica de los anticuerpos monoclonales anti-GD2, 14.G2a y 3F8, A novel O-acetylated ganglioside detected by anti-GD2 monoclonal antibodies, J.N.Y.E. et al., Int. J. Cancer, 50, 197-201 (1992), que pertenecen respectivamente a las inmunoglobulinas de clase IgG2a e IgG3 de ratón, se ha ensayado en estudios clínicos.

Estos estudios han puesto de relieve varios efectos secundarios negativos inherentes a los anticuerpos monoclonales de ratón. Uno de estos efectos negativos es una reacción alérgica o anafiláctica que puede atribuirse a una respuesta inmunitaria desarrollada por el ser humano contra los anticuerpos de ratón.

- 45 Con el fin de resolver este problema de inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales producidos en el ratón, es posible gracias a técnicas de ingeniería genética producir anticuerpos quiméricos. Se denomina anticuerpo "quimérico" un anticuerpo modificado genéticamente en el que una parte más o menos importante de la información genética que codifica el anticuerpo de ratón por la parte correspondiente de un anticuerpo humano. Generalmente, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos (V_H y V_L) se conservan, mientras que el resto de la molécula del anticuerpo proviene de un anticuerpo humano. Estos anticuerpos quiméricos conservan el reconocimiento específico del antígeno tumoral inherente al anticuerpo monoclonal de ratón presentando las propiedades físicas y efectoras inherentes al anticuerpo humano. Así, los estudios clínicos han demostrado que los

anticuerpos quiméricos ch.14G2a y ch.14.18 presentan una inmunogenicidad reducida y una vida media sérica incrementada en comparación con el anticuerpo monoclonal de ratón del que derivan. Además, se ha puesto de manifiesto que los anticuerpos monoclonales anti-GD2 de ratón presentan una capacidad incrementada para reclutar las células efectoras humanas cuando se quimerizan, mientras que los anticuerpos de ratón sólo tienen una capacidad limitada para reclutar estas células efectoras humanas.

La identificación de los anticuerpos murinos con anticuerpos humanos puede extenderse más conservando del anticuerpo murino sólo los aminoácidos de las regiones denominadas CDR o "regiones determinantes de la complementariedad" que constituyen el sitio de unión del antígeno y determinan por lo tanto la especificidad del anticuerpo. Se denomina anticuerpo "humanizado" un anticuerpo modificado genéticamente en el que se han conservado solamente los aminoácidos de las CDR, más eventualmente algunos aminoácidos cercanos a estas regiones CDR del anticuerpo de ratón de partida, y en el que el resto de la molécula proviene de un anticuerpo humano.

Inconvenientes de la técnica anterior

Una utilización terapéutica o diagnóstica in vivo de los anticuerpos monoclonales necesita que éstos reúnan cualidades particulares de especificidad, de afinidad y de ausencia de toxicidad. Ahora bien, los estudios clínicos realizados con anticuerpos monoclonales y quiméricos anti-GD2 ponen de relieve un efecto secundario negativo principal, no resuelto por la quimerización o humanización y que es la neurotoxicidad de los anticuerpos anti-GD2. En efecto, los pacientes que presentan un cáncer de origen neuroectodérmico a los cuales se administraron anticuerpos anti-GD2 presentaron dolores durante la administración de los anticuerpos y algunos de estos pacientes desarrollaron una neuropatía del sistema nervioso periférico. Estos efectos se explican por la presencia de gangliósidos GD2 en la superficie de las células de las fibras nerviosas del sistema periférico.

Se comprende que esta toxicidad nerviosa inherente a la utilización de los anticuerpos anti-GD2 ha limitado el desarrollo clínico de la inmunoterapia que utiliza estos anticuerpos. Sin embargo, el gran número de dianas antigénicas GD2 permanece como un factor de interés principal para la focalización inmune de los cánceres de origen neuroectodérmico.

Una estrategia que permitiría resolver el problema de toxicidad nerviosa sería utilizar un anticuerpo que reconociera un antígeno tumoral asociado con los cánceres de origen neuroectodérmico diferente del gangliósido GD2 y que no reconociera las fibras nerviosas del sistema periférico.

Hace algunos años, los inventores realizaron una serie de inmunizaciones de ratones con el fin de producir anticuerpos anti-GD2. Así, se han podido aislar varios anticuerpos anti-GD2 y su caracterización ha dado lugar principalmente a la identificación de un anticuerpo de la clase de las IgG3 de ratón denominado 8B6 que reconoce específicamente una molécula de gangliósido GD2 ligeramente modificada por la presencia de un grupo O-acetilo. Estos trabajos, y principalmente este anticuerpo 8B6, se describen en el artículo "Variable Region Gene Segments of Nine Monoclonal Antibodies Specific to Disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-Acetylated Derivatives", Cerato et al., Hybridoma Volumen 16, Número 4, 1997, 307-316, incorporado en la presente memoria por referencia.

La estructura de estos anticuerpos se ha estudiado, pero su desarrollo no se ha continuado. En efecto, no ha aparecido ningún interés particular de este nuevo anticuerpo respecto a los anticuerpos anti-GD2 conocidos. A diferencia de la forma no acetilada de GD2, la distribución tisular en el ser humano de GD2 O-acetilado permanece poco documentada debido a la ausencia de métodos de detección sensibles como los métodos inmunológicos que se basan en la utilización de anticuerpos monoclonales específicos de la forma acetilada de GD2. Por lo tanto, se presagió que la utilización clínica de este nuevo anticuerpo presentaría probablemente el mismo problema de neurotoxicidad que la utilización de los anticuerpos monoclonales anti-GD2. Además, no se ha puesto de manifiesto ninguna actividad citotóxica del anticuerpo 8B6 y los anticuerpos IgG3 no se manipulan fácilmente debido a su tendencia a aglutinarse.

Objetivos de la invención

Los anticuerpos monoclonales específicos del gangliósido GD2-O-acetilado que no reconocen el gangliósido GD2, podrían presentar la ventaja de no reconocer las fibras nerviosas del sistema periférico y por lo tanto no originar una toxicidad nerviosa. Dichos anticuerpos podrían presentar por lo tanto una ventaja principal en la focalización inmune de determinados tipos de cánceres como los cánceres humanos de origen neuroectodérmico que expresan el gangliósido GD2 bajo su forma O-acetilada respecto a los anticuerpos monoclonales anti-GD2.

Dichos anticuerpos podrán obtenerse por una variedad de técnicas conocidas por el experto en la técnica. Una parte de estas técnicas comienza por la inmunización de animales, principalmente roedores y entre éstos los ratones, ratas o hamsters, los lagomorfos y principalmente los conejos, los camélidos y entre éstos las llamas. El inmunógeno, preparación que contiene el antígeno contra el cual se van a obtener los anticuerpos, puede ser el glicolípido en sí mismo, purificado o contenido en una mezcla bruta o parcialmente purificada, el glicolípido o una de sus partes, principalmente la parte glicosilada hidrófila, opcionalmente acoplado de forma covalente o no a proteínas o lípidos que

5 sirven de "vehículo" para estimular la respuesta inmunitaria. En otro procedimiento de inmunización, el inmunógeno puede prepararse a partir de células que expresan el antígeno, obtenidas por cultivo celular de líneas de células tumorales o de células primarias obtenidas a partir de muestras tumorales. Entre las líneas útiles se pueden citar principalmente las líneas de células animales, como el timoma murino EL-4, o humanas, como el neuroblastoma humano IMR32, el glioblastoma humano U87MG, el carcinoma pulmonar de células pequeñas HCl-H82 y el melanoma humano M21. Estas células pueden administrarse enteras, vivas o fijadas, o fraccionarse para inyectar, por ejemplo, sólo una fracción parcialmente purificada que contiene los componentes de la membrana celular o del citoplasma.

10 Estos inmunógenos podrán administrarse a los animales por diversas vías, principalmente subcutánea, intra-peritoneal o intra-muscular, solos o en presencia de un adyuvante, principalmente alúmina o adyuvante de Freund. Las inmunizaciones pueden repetirse con una frecuencia que puede ir de algunos días a algunos meses.

15 Tres métodos generales podrán dar lugar a la obtención de anticuerpos utilizables en aplicaciones industriales. El primero consiste en extraer sangre de los animales inmunizados y extraer de ésta, por procedimientos conocidos por el experto en la técnica, fracciones que contienen el anticuerpo más o menos purificado (suero o plasma, inmunoglobulinas totales). Los anticuerpos pueden purificarse por técnicas cromatográficas o de inmunoadsorción. El segundo método consiste en extraer células capaces de sintetizar los anticuerpos, y principalmente células esplénicas o de ganglios linfáticos, e inmortalizarlas, principalmente por transformación viral o por hibridación somática según los procedimientos conocidos por el experto en la técnica. Entre las células inmortalizadas, la clonación permite seleccionar las células que producen los anticuerpos de interés y el cultivo celular permitirá aislar a partir de los sobrenadantes del cultivo estos anticuerpos y purificarlos en grandes cantidades. Finalmente, el tercer método consiste en aislar el ARN de células capaces de sintetizar los anticuerpos, principalmente células esplénicas, ganglios linfáticos o linfocitos periféricos extraídos de los animales, inmunizados o no, incluso de seres humanos y constituir bibliotecas de ADNc a partir de las cuales se seleccionarán las secuencias de anticuerpos de interés por cribado según los métodos conocidos por el experto en la técnica y principalmente por expresión de esta biblioteca en la superficie de una bacteriófago denominado sistema de expresión de *phage display* (exposición en fago). La construcción de bibliotecas combinatorias de regiones VH y VL humanas, expresadas en la superficie de fagos filamentosos ("exposición en fago"), bajo la forma de fragmentos "de cadena única" ("Fv de cadena única", scFv), que unen una región VH y una región VL o de fragmentos F(ab), constituidos por la cadena ligera asociada al segmento peptídico VH-CH1, correspondiendo este último al primer dominio de la región constante.

30 Los anticuerpos de la presente invención podrán seleccionarse a partir de los anticuerpos obtenidos por uno de los métodos descritos anteriormente porque reconocen el antígeno GD2-O-acetilado y no el antígeno GD2 no O-acetilado, propiedad que se denominará especificidad requerida. Esta selección podrá realizarse durante el procedimiento de aislamiento de los anticuerpos, por ejemplo propagando sólo las células que producen los anticuerpos que poseen la especificidad requerida. Alternativamente, se podrá buscar entre los anticuerpos ya aislados, los que poseen esta especificidad. Para este fin, puede utilizarse una variedad de métodos, principalmente la inmunofluorescencia indirecta sobre células para distinguir aquellos anticuerpos que reconocen las células que se sabe que expresan el GD2 O-acetilado, principalmente IMR32, los que reconocen igualmente las células que expresan el GD2 pero no el GD2 O-acetilado, principalmente Neuro 2A. Se podrá utilizar igualmente un ensayo inmuno-enzimático ELISA sobre las células desecadas para seleccionar los anticuerpos que se fijan únicamente sobre las células que expresan el GD2 O-acetilado y no sobre las células que sólo expresan GD2. También se podrán seleccionar los anticuerpos que presentan la especificidad requerida utilizando la cromatografía en capa fina sobre sílice para separar los componentes glicolipídicos de las células que expresan a la vez GD2 O-acetilado y GD2, principalmente IMR32, reteniendo sólo los anticuerpos que marcan solamente la banda correspondiente al GD2-O-acetilado. Se podrá confirmar este resultado destruyendo por tratamiento alcalino el GD2 O-acetilado en el extracto lipídico y verificando que el marcaje se ha suprimido. Los ejemplos de aplicación de estas técnicas para la confirmación de la especificidad de los anticuerpos de la presente invención se proporcionan en la descripción detallada de la invención, más adelante en la presente memoria. Otros métodos, que pretenden el mismo resultado, podrán ponerse a punto por el experto en la técnica.

50 Los anticuerpos de la presente invención podrán modificarse por una variedad de técnicas conocidas por el experto en la técnica para adaptarlos a diferentes aplicaciones. Se podrán utilizar así los métodos conocidos de la técnica anterior para producir los anticuerpos de cadena única scFv así como una variedad de proteínas de fusión que conservan la capacidad de unir el antígeno. Se sabe en particular que se pueden modificar enteramente las regiones denominadas constantes de los anticuerpos, por ejemplo para cambiar las regiones constantes murinas por regiones constantes de anticuerpos humanos, sin perder el reconocimiento del antígeno. La construcción de un anticuerpo quimérico consiste en aislar el ADN que codifica la región VH y la región VL de un anticuerpo monoclonal de ratón y unirlo al ADN que codifica las regiones constantes H y L de una inmunoglobulina humana. Dicha construcción genética permite producir un anticuerpo híbrido cuya parte constante, humana, no es o es muy poco inmunógena en el ser humano (se trata en general de la región constante de las IgG1 humanas y la región Ckappa humana). Se sabe incluso conservar solamente las regiones indispensables para el reconocimiento del antígeno, las regiones denominadas hipervariables, regiones que determinan la complementariedad o CDR y reemplazar las demás para operar lo se denomina una "humanización" del

anticuerpo. El conjunto de estas proteínas se designará por el término "anticuerpos modificados artificialmente" para facilitar la descripción.

Algunas de estas proteínas tienen un interés particular para los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos modificados artificialmente anti-GD2 O-acetilados que conservan el reconocimiento del gangliósido GD2 O-acetilado sin reconocer el gangliósido GD2, podrían presentar una ventaja importante respecto a los anticuerpos monoclonales anti-GD2 O-acetilados de ratón porque tendrían características físicas y efectoras superiores.

Los anticuerpos modificados artificialmente específicos del GD2 O-acetilado deberán tener una afinidad suficiente para el antígeno correspondiente de manera que se elimina al máximo la difusión de este anticuerpo, llegado el caso portador de una sustancia tóxica o terapéutica en los tejidos o células sanos. En el marco de la presente invención, la afinidad para el gangliósido GD2 deberá ser superior a 10^7 moles/litro. La afinidad de estos anticuerpos podrá aumentarse por técnicas conocidas por el experto en la técnica. Así, la expresión de fragmentos de anticuerpos en la superficie de bacteriófagos constituye una herramienta preciosa para la búsqueda de mutantes de alta afinidad a partir de un scFv dado. Es así posible mimetizar la maduración de la afinidad observada durante el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Las técnicas de mutaciones aleatorias o de mutaciones dirigidas, seguidas de una selección por ciclos repetidos de inmuno-adsorción/elución se han empleado así con éxito y han permitido obtener fragmentos de anticuerpos que tienen una afinidad cerca de 10 veces superior a la del fragmento inicial.

Un objeto particular de la presente invención, que no debe limitar ésta a este ejemplo, se refiere a los anticuerpos modificados artificialmente preparados a partir del anticuerpo 8B6 del que se sabe que presenta la especificidad requerida, así como a las proteínas recombinantes utilizando las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad definidas SEQ ID NO: 2 a 4 y SEQ ID NO: 6 a 8.

Es igualmente un objeto de la invención proponer modificaciones de los anticuerpos que presentan la especificidad requerida con el fin de conferirles propiedades útiles para el diagnóstico o la terapéutica de determinados cánceres. Algunas de estas aplicaciones necesitan la inyección de los anticuerpos o de sus derivados en enfermos que padecen determinadas patologías cancerosas. En este caso, se preferirán los derivados cuya secuencia se parezca más a una secuencia de anticuerpo humano porque son susceptibles de limitar la producción por el paciente tratado de anticuerpos contra la molécula inyectada, aumentando de esta manera la tolerancia y permitiendo una administración repetida. Dichos derivados son por otra parte susceptibles de favorecer la respuesta de anticuerpos contra determinantes específicos particulares del anticuerpo inyectado, denominados anticuerpos anti-idiotipos, que se han presentado como que poseen un interés terapéutico.

Para las aplicaciones terapéuticas, las modificaciones preferidas serán aquellas que permitan obtener una actividad citotóxica contra las células tumorales que expresan el antígeno diana, aquí el GD2 O-acetilado.

Se sabe que sólo determinadas clases de inmunoglobulinas poseen la propiedad de activar el complemento o de inducir una citotoxicidad con mediación celular. A título de ejemplo, el anticuerpo 8B6 reconoce el GD2 O-acetilado pero no es capaz de inducir esta citotoxicidad con bastante eficacia. Es por lo tanto otro objeto de esta invención proponer anticuerpos que reconocen el GD2 O-acetilado y que poseen una actividad citotóxica. Esto puede obtenerse principalmente reemplazando las regiones constantes del anticuerpo por regiones constantes de anticuerpos capaces de incitar esta citotoxicidad y principalmente regiones constantes de inmunoglobulinas humanas de clase I. El poder citotóxico podrá aumentarse, principalmente produciendo anticuerpos glicosilados de forma particular, y principalmente poco fucosilados, por ejemplo produciéndolos por células especialmente seleccionadas o transformadas. Podrán introducirse igualmente mutaciones específicas, descritas en la bibliografía, en la secuencia del anticuerpo para el mismo efecto.

Otra manera de realizar los anticuerpos terapéuticos según la presente invención es asociar a un derivado de anticuerpo que presenta la especificidad requerida un agente citotóxico. Dicho agente citotóxico podrá ser un agente tóxico químico, ARN antisentidos, y principalmente un medicamento antitumoral citotóxico, entre los cuales se pueden citar los taxanos, alcaloides de la vinca y sus derivados, antraciclinas, agentes alquilantes, un agente tóxico biológico, y principalmente toxinas vegetales o bacterianas, entre las cuales se pueden citar la ricina o la toxina de pseudomonas, o incluso un isótopo radiactivo que emite partículas beta, como yodo 131, itrio 90, lutetio 177, renio 186 o cobre 67, o electrones Auger, como indio 111 o incluso partículas alfa, como bismuto 213, bismuto 212 o astato 211, no debiendo estos casos limitar en ningún caso el alcance de la invención. El anticuerpo puede producirse igualmente por métodos de ingeniería molecular, conocidos por el experto en la técnica, en la forma de una proteína de fusión asociada con una citoquina. Las citoquinas utilizadas son esencialmente de la familia de las interleuquinas como la interleuquina- 2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16 e IL-18, factores de crecimiento hematopoyéticos tal como GM-CSF (Factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos, *granulocyte macrophage Colony Stimulating Factor*) o G-CSF (Factor estimulante de las colonias de granulocitos, *granulocyte Colony Stimulating Factor*), Factor de Necrosis Tumoral

(*Tumor Necrosis Factor*) (TNF), quimioquinas. La proteína de fusión anticuerpo-citoquina obtenida posee las propiedades biológicas de la citoquina y la especificidad del anticuerpo del que deriva.

5 Los anticuerpos de la presente divulgación podrán aplicarse igualmente ventajosamente al diagnóstico, ya sea practicado *in vitro* para la detección de la presencia del antígeno GD2 O-acetilado en las muestras de células o de fluidos biológicos según una cualquiera de las técnicas conocidas por el experto en la técnica, o también practicado *in vivo* por la administración de un derivado del anticuerpo modificado para convertirlo en detectable por una de las técnicas médicas de formación de imágenes conocidas, es decir escintigrafía o tomografía de emisión de positrones. En este caso, el derivado del anticuerpo se asociará a un isótopo radiactivo emisor de fotones gamma, como yodo 131, yodo 123, indio 111 o tecnecio 99m para la formación de imágenes escintigráficas o tomografía de fotones simples o a un isótopo emisor de positrones, como flúor 18, yodo 124, itrio 86, cobre 64, escandio 44, para la tomografía de emisión de positrones, no debiendo estos ejemplos una vez más limitar el campo de la invención.

10 Los anticuerpos de la presente invención podrán asociarse a compuestos tóxicos o radiactivos. Los productos tóxicos se acoplan químicamente, de forma covalente, a los anticuerpos por una variedad de uniones químicas, entre las cuales se pueden citar las uniones ésteres, amidas, disulfuros o tioéteres. Los átomos radiactivos se acoplan bien directamente por sustitución electrófila (caso de los isótopos de yodo) o nucleófila (caso del flúor 18) o mediante un sintón radiomarcado reactivo, y principalmente el reactivo de Bolton y Hunter para los isótopos de yodo o los ésteres activados estanielados para los isótopos de yodo o astato 211, o incluso mediante un agente quelante cuando se trata de un metal radiactivo. En este último caso, el experto en la técnica sabrá elegir entre los quelantes que proporcionarán con el metal un complejo con una buena estabilidad en los fluidos biológicos. Así, podrá utilizarse ventajosamente el DTPA con indio 111, pero el DOTA será preferible para un marcaje con itrio 90.

15 Los anticuerpos de la presente invención podrán utilizarse en métodos conocidos para el experto en la técnica en los que el agente tóxico o detectable no está unido directamente al anticuerpo, sino que al contrario está unido a una molécula de bajo peso molecular administrada en una segunda etapa, después de que un derivado del anticuerpo capaz de reconocer *in vivo* a esta pequeña molécula se haya administrado al paciente. En este caso, el derivado del anticuerpo es principalmente un anticuerpo biespecífico o un inmunocombinado o una proteína de fusión entre un derivado del anticuerpo y una avidina. Esta estrategia podrá utilizarse ventajosamente con los anticuerpos de la presente invención para el tratamiento de tumores, e igualmente esta estrategia podrá utilizarse con los anticuerpos de la presente divulgación para el diagnóstico *in vivo* de los tumores.

25 El anticuerpo de la presente invención y los "derivados", "anticuerpos derivados" o "productos derivados" podrán por lo tanto utilizarse ventajosamente para la terapéutica de estos tumores. El anticuerpo de la presente divulgación y los "derivados", "anticuerpos derivados" o "productos derivados" podrán por lo tanto utilizarse para el diagnóstico de estos tumores. Entre éstos se encuentran los tumores de origen neuroectodérmico y principalmente los melanomas, cánceres de pulmón de células pequeñas, gliomas y neuroblastomas. Los productos de la presente invención podrán aplicarse ventajosamente a la detección y al tratamiento de estos tumores, principalmente cuando éstos están diseminados o escapan de los tratamientos existentes.

Resumen de la invención

La presente invención describe la utilidad de anticuerpos en la focalización inmune de los cánceres humanos de origen neuroectodérmico tales como los melanomas, glioblastomas, carcinomas pulmonares de células pequeñas y neuroblastomas.

40 En el conjunto de los diferentes aspectos de la invención descritos anteriormente, es particularmente sorprendente constatar que un anticuerpo monoclonal específico de GD2 O-acetilado no se fija sobre las fibras nerviosas que expresan GD2 mientras que reconoce las células tumorales que expresan el gangliósido GD2 y su forma O-acetilada. Dichos anticuerpos poseen por lo tanto una especificidad restringida a las células tumorales de origen neuroectodérmico y no reconocen las fibras nerviosas del sistema periférico. La consecuencia de esta especificidad incrementada es una toxicidad reducida en las aplicaciones terapéuticas que resultan principalmente de la ausencia de fijación sobre los tejidos nerviosos periféricos normales que se observa con los anticuerpos que reconocen el gangliósido GD2. La presente invención abarca por lo tanto la utilización de dichos anticuerpos para el diagnóstico y la terapéutica de los cánceres con una especificidad incrementada y una toxicidad reducida respecto a los anticuerpos que reconocen GD2.

45 Los anticuerpos de la presente invención tienen una actividad citotóxica para las células tumorales que reconocen, bien intrínsecamente (ésta es una de las razones por las que se les quimeriza o humaniza), bien porque sirven de vectores para agentes tóxicos, radiactivos principalmente.

50 La presente divulgación abarca por lo tanto cualquier anticuerpo monoclonal quimérico o humanizado que sólo reconoce la forma O-acetilada del gangliósido GD2, o fragmento de este anticuerpo, reconociendo dicho anticuerpo o dicho

fragmento las moléculas de GD2 O-acetilado expresadas por las células tumorales y no reconociendo las moléculas de GD2 expresadas en la superficie de los nervios periféricos.

5 La presente divulgación abarca igualmente los anticuerpos en los que determinados aminoácidos se han reemplazado por otros utilizando las técnicas de genética molecular conocidas por el experto en la técnica, principalmente para modificar las propiedades del anticuerpo original, en particular para disminuir su inmunogenicidad o para aumentar su actividad tóxica o incluso para acelerar o ralentizar su eliminación después de la inyección.

Ventajosamente, el anticuerpo monoclonal modificado artificialmente o fragmento de éste según la divulgación, se caracteriza porque es una IgG kappa con una afinidad superior a 10^{-7} moles/litro para el GD2-O-acetilado y una afinidad al menos diez veces más baja para el GD2 en sí mismo, siendo dicho anticuerpo o dicho fragmento mono o biespecífico.

10 Principalmente, pero no exclusivamente, la divulgación abarca cualquier anticuerpo monoclonal modificado artificialmente o fragmento de éste, en el que las regiones que determinan la complementariedad de la región variable de la cadena H tienen como secuencias de aminoácidos las representadas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y las regiones que determinan la complementariedad de la región variable de la cadena L tienen como secuencias de aminoácidos las representadas en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

15 Principalmente, pero no exclusivamente, la divulgación abarca cualquier anticuerpo monoclonal modificado artificialmente o fragmento de éste, en el que la cadena pesada se obtiene por la unión entre el ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo no humano y el ADNc que codifica la región constante de una inmunoglobulina humana y en el que la cadena ligera se obtiene por la unión entre el ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera del mismo anticuerpo no humano y el ADNc que codifica la región constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina humana caracterizado porque dicho anticuerpo no humano es el anticuerpo monoclonal de ratón 8B6 y dicho anticuerpo modificado artificialmente está dirigido contra el gangliósido GD2 O-acetilado y no reconoce las fibras nerviosas del sistema periférico.

20 Principalmente, pero no exclusivamente, la divulgación abarca cualquier anticuerpo monoclonal modificado artificialmente o fragmento de éste, en el que la región variable de la cadena pesada posee la secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO: 1 y en el que la región variable de la cadena ligera posee la secuencia deducida en aminoácidos definida por SEQ ID NO: 5.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal modificado artificialmente o fragmento de éste según la reivindicación 5, es el anticuerpo KM8B6 que se puede obtener mediante la línea celular CHO o un fragmento de éste.

30 La divulgación abarca igualmente cualquier molécula farmacéutica derivada del anticuerpo modificado artificialmente o de un fragmento de éste según la invención en la que el anticuerpo o el fragmento de éste se acopla con una molécula X, en la que X es una molécula tóxica, un medicamento, un pro-fármaco o un segundo anticuerpo sea cual sea su especificidad.

Según una variante, dicha molécula tóxica es una molécula tóxica química, biológica o radiactiva, estando destinada dicha molécula a destruir las células tumorales que expresan el gangliósido GD2-O-acetilado.

35 Preferentemente, dichas células tumorales diana de las moléculas farmacéuticas según la invención son células de neuroblastoma, melanoma, glioblastoma o de cáncer pulmonar de células pequeñas.

Preferentemente, las moléculas farmacéuticas según la divulgación están mutadas a nivel de su región Fc por la adición de azúcares, modulando así la activación de las células inmunitarias y de las moléculas del sistema del complemento.

40 La divulgación abarca igualmente cualquier molécula para el diagnóstico de los cánceres que muestran una expresión del gangliósido GD2 O-acetilado en la superficie de las células tumorales, derivándose dicha molécula del anticuerpo modificado artificialmente o de un fragmento de éste según la invención, en la que dicho anticuerpo o dicho fragmento está unido a un agente que permite la detección del anticuerpo o de dicho fragmento por fluorescencia o radiactividad.

45 La divulgación se refiere por lo tanto a la utilización de un anticuerpo modificado artificialmente o de un fragmento de éste según la invención y/o de una molécula según la invención, para la fabricación de un medicamento para la terapia de un cáncer en el que las células expresan la forma O-acetilada del gangliósido GD2 o para la fabricación de un producto para el diagnóstico de dicho cáncer.

La presente invención abarca igualmente cualquier utilización del anticuerpo monoclonal 8B6 (descrito en el artículo "Variable Region Gene Segments of Nine Monoclonal Antibodies Specific to Disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-Acetylated Derivatives", Cerato et al., Hybridoma Volumen 16, Número 4, 1997, 307-316) para la fabricación de una

molécula farmacéutica en la que dicho anticuerpo está unido a un agente tóxico químico, biológico o radiactivo, estando destinada dicha molécula a destruir las células tumorales que expresan el gangliósido GD2-O-acetilado.

Principalmente, pero no exclusivamente, la invención abarca dicha utilización cuando dichas células son células de neuroblastoma, melanoma, glioblastoma o de cáncer pulmonar de células pequeñas.

- 5 Principalmente, pero no exclusivamente, la invención abarca dicha utilización cuando dicha molécula terapéutica está mutada a nivel de su región Fc por la adición de azúcares, modulando así la activación de las células inmunitarias y de las moléculas del sistema del complemento.

- 10 La divulgación abarca igualmente cualquier utilización del anticuerpo monoclonal 8B6 para la fabricación de una molécula para el diagnóstico de los cánceres que muestran una expresión del gangliósido GD2-O-acetilado en la superficie de las células tumorales, derivándose dicha molécula de dicho anticuerpo, en la que dicho anticuerpo está unido a un agente que permite la detección del anticuerpo por fluorescencia o radiactividad.

La divulgación también abarca cualquier secuencia de ADN que codifica el anticuerpo modificado artificialmente según la invención así como cualquier vector de expresión que comprende dicha secuencia de ADN unida de forma operacional a un promotor.

- 15 La divulgación también abarca cualquier célula, principalmente animal, que comprende dicho vector de expresión, así como cualquier transformante no humano que produce el anticuerpo modificado artificialmente según la invención.

Finalmente la divulgación abarca cualquier procedimiento para la producción del anticuerpo modificado artificialmente para el gangliósido GD2-O-acetilado, comprendiendo este procedimiento la expresión de la secuencia de ADN en una célula o un transformante no humano en las condiciones apropiadas y la recuperación del anticuerpo.

- 20 Preferentemente, la célula o el transformante se cultiva en condiciones en las que se acumula el anticuerpo.

Descripción breve de las figuras

Fig. 1 describe la construcción del plásmido, pcDNA3@60C3 L-VL.

Fig. 2 describe la construcción del plásmido, pcDNA3@60C3 L.

Fig. 3 describe la construcción del plásmido, pcDNA3@ KM8B6L.

- 25 Fig. 4 describe la secuencia nucleotídica y la secuencia deducida de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo modificado artificialmente KM8B6.

Fig. 5 describe la construcción del plásmido, pBluescript® II SK (+) 60C3 L-VH.

Fig. 6 describe la construcción del plásmido, pBluescript® II SK (+) KM60C3-H.

Fig. 7 describe la construcción del plásmido, pBluescript® II SK (+) KM8B6-H.

- 30 Fig. 8 describe la construcción del plásmido, pcDNA3.1/Hygro® (+) KM8B6-H.

Fig. 9 describe la secuencia nucleotídica y la secuencia deducida de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo modificado artificialmente KM8B6.

- 35 Fig. 10 describe el análisis SDS-PAGE del anticuerpo modificado artificialmente anti-GD2-O-acetilado purificado, KM8B6. El análisis se realizó en condiciones reductoras (izquierda) y no reductoras (derecha). De izquierda a derecha, marcador de peso molecular, KM8B6, IgG3 8B6 (condiciones reductoras), marcador de alto peso molecular, KM8B6 e IgG3 8B6 (condiciones no reductoras).

- 40 Fig. 11 es un gráfico que describe la reactividad del anticuerpo 8B6 y del anticuerpo KM8B6 en las células IMR 32 y NeuroA, que poseen o no los antígenos GD2-O-acetilados respectivamente, medida por inmunofluorescencia, con en ordenadas el número de células detectado y en abscisas la intensidad de la fluorescencia. El trazo azul corresponde a la reactividad del control y el trazo rojo corresponde a la reactividad de los productos.

Fig. 12 es un gráfico que describe la reactividad de los anticuerpos 8B6 y KM8B6 analizada por ensayo ELISA en las células IMR 32 y NeuroA.

Fig. 13 muestra el perfil de inmunotinción obtenido con el anticuerpo KM8B6 de los gangliósidos de cerebro de rata separados por cromatografía en capa fina de sílice. Carril A tinción con resorcinol de las migraciones de los diferentes gangliósidos de cerebro de rata.

5 Fig. 14 muestra los resultados del análisis inmuno-histoquímico de células de neuroblastoma y de fibras nerviosas humanas.

Fig. 15 muestra los resultados del estudio de toxicidad (ADCC) Porcentaje de actividad ADCC del anticuerpo modificado artificialmente KM8B6 y del AcM de ratón 8B6 del que deriva. * Anticuerpo Rituxan® anti-CD20 utilizado como control negativo.

10 Fig. 16 muestra los resultados del estudio in vivo en el ratón del efecto anti-tumoral del AcM 8B6 contra el timoma murino EL4 que expresa el antígeno GD2-O-acetilado.

Descripción detallada de la invención

Producción del anticuerpo modificado artificialmente KM8B6

1. Preparación del ADNc que codifica la región variable L-VL del anticuerpo monoclonal de ratón 60C3

(a). Extracción del ARN total del hibridoma 60C3, productor del anticuerpo monoclonal 60C3.

15 El ARN total se extrae a partir de 106 células de hibridoma 60C3 en fase exponencial de crecimiento gracias al reactivo RNable (Eurobio, Courtaboeuf, Francia) según las recomendaciones del proveedor. La concentración de ARN total se determina por la medida de la densidad óptica a 260 nm.

(b). Obtención de la secuencia nucleotídica del ADNc 60C3 L-VL

20 La amplificación génica del ADNc que codifica la región variable 60C3 L-VL se obtuvo a partir de los ARN mensajeros por RACE-PCR de manera que se obtiene la secuencia nucleotídica que codifica el péptido señal (L) asociado a su región variable (VL). Esta amplificación se realizó utilizando el kit SMARTTM RACE de Amplificación de ADNc obtenido de la empresa BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU) según las recomendaciones del proveedor. La cantidad de ARN total utilizada para la retrotranscripción es 1 µg. El producto de la reacción se diluyó en 100 µL de disolución tampón tricina EDTA suministrada por el proveedor. Un volumen de 2,5 µL del producto diluido se utilizó para la amplificación génica. El cebador antisentido específico del ADNc 60C3 VL utilizado es el siguiente: 3'-60C3 VL 5'-TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC AGC-3'. La amplificación se realizó por incubación de la mezcla de reacción en un termociclador Perkin-Elmer (PE) DNA thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Wellesley, MA, EEUU) en las condiciones siguientes: 5 ciclos (94°C durante 5 segundos, 72°C durante 3 minutos), seguido de 5 ciclos (94°C durante 5 segundos y 70°C durante 10 segundos seguido de 3 minutos a 72°C) y de 25 ciclos (94°C durante 5 segundos seguido de 69°C durante 10 segundos y 3 minutos a 72°C). El producto de la reacción de RACE-PCR se analiza por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Q. Biogene, Morgan Irvine, CA, EEUU) en una disolución tampón de migración de Tris EDTA pH 8 (40 mM Tris-base (Sigma Chemicals Co), 25 mM EDTA (Inerchim, Montluçon, Francia), 20 mM ácido acético (Carlo Erba Reagenti SpA, Ródano, MI, Italia). Los productos con el peso molecular esperado se purifican mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. La determinación de la secuencia de ácido nucleico de los productos purificados obtenidos se realizó por la empresa GENOME exprés (Meylan, Francia) con el fin de verificar la secuencia del ADNc que codifica la región 60C3 L-VL. La secuencia correspondiente al péptido señal asociado con la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 60C3 se determinó así y los cebadores se diseñaron para permitir la clonación del ADNc 60C3 L-VL en el vector de expresión.

(c). Amplificación del ADNc 60C3 L-VL

40 La amplificación del ADNc 60C3 L-VL se obtuvo por reacción de RT-PCR a partir de un extracto de ARN total de células de hibridoma 60C3. La mezcla de reacción es la siguiente: Oligo d(T)18 0,5 µg (New England Biolabs Inc. Beverly, MA, EEUU), ARN 1 µg, dNTP 0,5 mM (Promega, Madison, WI, EEUU), agua estéril csp 12 µL. Esta mezcla se incubó 5 minutos a 65°C (baño maría seco) y 2 minutos a 4°C (hielo fundente) para desnaturalizar el ARN. Se añaden a la mezcla de reacción, 4 µL de disolución tampón 5X Tampón de Primera cadena (Invitrogen Life Biotechnologies), 10 mM DTT (Invitrogen Life Biotechnologies), 160 U de Rnasina (Promega) y 800 U de transcriptasa inversa (Invitrogen Life Biotechnologies). El conjunto se incubó 1 hora a 37°C y a 70°C durante 15 minutos con el fin de parar la reacción. Las copias de ADNc 60C3 L-VL se obtienen por amplificación génica gracias a una reacción de PCR que utiliza los oligonucleótidos de síntesis que son los siguientes: 5'-BamHI 60C3 L-VL: 5'-ag gga tcc aaa gac aaa atg gat-3' (cebador con sentido) y 3'-XhoI 60C3 L-VL: 5'-tt cag ctc gag ctt ggt ccc agc acc-3' (cebador anti-sentido).

Los cebadores de síntesis utilizados permiten la introducción de mutaciones silenciosas en la secuencia de ADN que no implican ninguna modificación a nivel de la secuencia de aminoácidos permitiendo la aparición de los sitios de restricción BamHI y XhoI necesarios para la clonación en el vector.

5 El medio de reacción tiene la composición siguiente: dNTP (Promega) 500 μ M, Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 1 μ L, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 μ L, ADNc (matriz) 1 μ L, MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-XhoI 60C3 L-VL y cebador 5'-BamHI 60C3 500 μ M.

La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 (Peltier Thermal Cycler) según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C.

10 Después de la verificación de los productos de PCR por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%, el ADNc 60C3 L-VL se purifica mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor.

2. Construcción de un plásmido recombinante que posee el ADNc 60C3 L-VL: pcDNA3® 60C3 L-VL.

(a). Digestión del vector pcDNA3® y del ADNc 60C3 L-VL y desfosforilación del vector digerido

15 La digestión con las enzimas de restricción permite obtener un vector lineal que presenta extremos cohesivos necesarios para la inserción del ADNc de interés. La digestión se hace en las condiciones siguientes: tampón NEB2 10X (5 μ L), BSA 100X (0,5 μ L), vector pcDNA3® o ADNc 60C3 L-VL (1 μ g), enzima de restricción BamHI (10 U), enzima de restricción XhoI (10 U). Las enzimas de restricción, las disoluciones tampones de reacción y la disolución de BSA son de New England Biolabs Inc. La reacción se continúa 3 horas en baño maría a 37°C. El vector y el inserto digeridos se purifican gracias al kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. El vector se desfosforila con CIP (New England Biolabs Inc.) durante 1 hora a 37°C. La composición de la mezcla de reacción es la siguiente: tampón NEB3 10X (5 μ L), vector (1 μ g), CIP (1 μ L). Esta reacción permite aumentar el rendimiento de la ligación disminuyendo el porcentaje de autoligación del vector. En efecto, el hecho de suprimir los grupos fosfato en los extremos 5' y 3' de los bordes liberados por la digestión impide el cierre espontáneo del vector.

20

(b). Reacción de ligación

25 La ligación permite insertar el ADNc 60C3 L-VL digerido en el vector pcDNA3® digerido y desfosforilado gracias a la T4 ligasa (New England Biolabs Inc.). La reacción se continúa en baño maría a 16°C durante 16 horas en el medio de reacción siguiente: disolución tampón de ligación 5X (4 μ L) (New England Biolabs Inc.), vector digerido desfosforilado 200 ng, T4 ligasa (400 U) (New England Biolabs Inc.), ADNc purificado 170 ng (para un inserto de 1 kb). La relación molar inserto/vector es 3/1.

(c). Transformación de bacterias competentes E. coli XL1 blue (Stratagene)

30 Se añaden 20 μ L de producto de la reacción de ligación a 100 μ L de suspensión de bacterias competentes. El conjunto se incuba a 4°C durante 30 minutos. Las bacterias se someten a un choque térmico de 2 minutos a 42°C, seguido de 2 minutos a 4°C. Se añade un volumen de 1 mL de medio LB y las bacterias se incuban 1 hora a 37°C con agitación (250 rpm). Las bacterias se recuperan por centrifugación durante 5 minutos a 4.000 g a 4°C. El sedimento bacteriano se recoge en 100 μ L de medio LB antes de distribuir en un frasco de Petri que contiene el medio agar 2XTY que contiene 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma Chemicals Co) y 12,5 μ g/mL de tetraciclina (Sigma Chemicals Co). Las colonias resistentes aparecen después de una noche de incubación a 37°C.

35

(d). Verificación de la presencia del inserto 60C3 L-VL en el vector pcDNA3® por reacción de PCR

40 Las colonias aisladas se depositan estérilmente en campana respectivamente en un tubo que contiene la mezcla de reacción de PCR: dNTP (Promega) 500 μ M, Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies) 1 μ L, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 μ L, ADNc (matriz) 1 μ L, MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-XhoI 60C3 L-VL y cebador 5'-BamHI 60C3 500 μ M.

45 La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C. El tamaño del producto de PCR amplificado se controla por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%. Los clones que se han transformado correctamente son los únicos que proporcionan un producto de PCR con el tamaño esperado.

(e). Producción del plásmido de interés pcDNA3® 60C3 L-VL

Se utiliza un palillo estéril que después de tomar la colonia se pone en 5 mL de medio líquido selectivo LB que contiene 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma Chemicals Co) y 12,5 μ g/mL de tetraciclina (Sigma Chemicals Co) y se incuba 16 horas

a 37°C. La dilución bacteriana se utiliza para la realización de una minipreparación de ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN) según las recomendaciones del proveedor.

3. Preparación del ADNc que codifica la región constante hu-C kappa de un anticuerpo monoclonal humano P3Non2

(a). Extracción del ARN total del hibridoma P3Non2, productor del anticuerpo monoclonal P3Non2.

- 5 El ARN total se extrae a partir de 106 células de hibridoma P3Non2 en fase exponencial de crecimiento gracias al reactivo RNAspure (Eurobio, Courtaboeuf, Francia) según las recomendaciones del proveedor. La concentración de ARN total se determina por la medida de la densidad óptica a 260 nm.

(b). Amplificación del ADNc hu-C kappa

- 10 La amplificación del ADNc hu-C kappa se obtuvo por reacción de RT-PCR a partir de un extracto de ARN total de células de hibridoma p3Non2. La mezcla de reacción es la siguiente: Oligo d(T)18 0,5 µg (New England Biolabs Inc. Beverly, MA, EEUU), ARN 1 µg, dNTP 0,5 mM (Promega, Madison, WI, EEUU), agua estéril csp 12 µL. Esta mezcla se incubó 5 minutos a 65°C (baño maría seco) y 2 minutos a 4°C (hielo fundente) para desnaturalizar el ARN. Se añaden a la mezcla de reacción, 4 µL de disolución tampón 5X Tampón de Primera cadena (Invitrogen Life Technologies), 10 mM DTT (Invitrogen Life Technologies), 160 U de Rnasina (Promega) y 800 U de transcriptasa inversa (Invitrogen Life Technologies). El conjunto se incubó 1 hora a 37°C y a 70°C durante 15 minutos con el fin de parar la reacción. Las copias de ADNc 60C3 L-VL se obtienen por amplificación génica gracias a una reacción de PCR que utiliza los oligonucleótidos de síntesis que son los siguientes: 5'-XhoI hu-C kappa: 5'-ag ctc gag ctg aaa cga act gtg gca c-3' (cebador con sentido) y 3'-XbaI hu-C kappa: 5'-ctt cta gat tta aca ctc tcc cct gtt ga -3' (cebador anti-sentido).

- 20 Los cebadores de síntesis utilizados permiten la introducción de mutaciones silenciosas en la secuencia de ADN que no implican ninguna modificación a nivel de la secuencia de aminoácidos permitiendo la aparición de los sitios de restricción XbaI y XhoI necesarios para la clonación en el vector.

El medio de reacción tiene la composición siguiente: dNTP (Promega) 500 µM, Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 1 µL, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 µL, ADNc (matriz) 1 µL, MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-XbaI hu-C kappa y cebador 5'-XhoI hu-C kappa 500 µM.

- 25 La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 (Peltier Thermal Cycler) según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C.

Después de la verificación de los productos de PCR por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%, el ADNc hu-C kappa se purifica mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor.

- 30 4. Construcción del vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo modificado artificialmente KM 60C3: pcDNA3@ KM60C3-L

(a). Digestión del vector pcDNA3@ 60C3 L-VL y del ADNc hu-C kappa y desfosforilación del vector digerido

- 35 La digestión se hace en las condiciones siguientes: tampón NEB2 10X (5 µL), BSA 100X (0,5 µL), vector pcDNA3@ 60C3 L-VL o ADNc hu-C kappa (1 µg), enzima de restricción XhoI (10 U), enzima de restricción XbaI (10 U). Las enzimas de restricción, las disoluciones tampones de reacción y la disolución de BSA son de New England Biolabs Inc. La reacción se continúa 3 horas en baño maría a 37°C. El vector y el inserto digeridos se purifican gracias al kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. El vector se desfosforila con CIP (New England Biolabs Inc.) durante 1 hora a 37°C. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB3 10X (5 µL), vector (1 µg), CIP (1 µL).

(b). Reacción de ligación

- 40 La ligación permite insertar el ADNc hu-C kappa digerido en el vector pcDNA3@ 60C3 L-VL digerido y desfosforilado gracias a la T4 ligasa (New England Biolabs Inc.). La reacción se continúa en baño maría a 16°C durante 16 horas en el medio de reacción siguiente: disolución tampón de ligación 5X (4 µL) (New England Biolabs Inc.), vector digerido desfosforilado 200 ng, T4 ligasa (400 U) (New England Biolabs Inc.), ADNc purificado 170 ng (para un inserto de 1 kb). La relación molar inserto/vector es 3/1. El producto de la reacción de ligación se utiliza para la transformación de bacterias competentes E. coli XL1 blue (Stratagene).

(c). Verificación de la presencia del inserto hu-Ckappa en el vector pcDNA3@ 60C3 L-VL por reacción de PCR

Las colonias resistentes aisladas se depositan estérilmente en campana en un tubo que contiene la mezcla de reacción de PCR: dNTP (Promega) 500 μ M, Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies) 1 μ L, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 μ L, ADNc (matriz) 1 μ L, $MgCl_2$ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-XbaI hu-C kappa y cebador 5'-XhoI hu-C kappa 500 μ M. La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C. El tamaño del producto de PCR amplificado se controla por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%. Los clones que se han transformado correctamente son los únicos que proporcionan un producto de PCR con el tamaño esperado.

(d). Producción del plásmido de interés pcDNA3® KM60C3-L

Se utiliza un palillo estéril que después de tomar la colonia se pone en 5 mL de medio líquido selectivo LB que contiene 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma Chemicals Co) y 12,5 μ g/mL de tetraciclina (Sigma Chemicals Co) y se incuba 16 horas a 37°C. La dilución bacteriana se utiliza para la realización de una minipreparación de ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN) según las recomendaciones del proveedor.

5. Construcción del vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo modificado artificialmente KM 8B6: pcDNA3® 8B6-L

(a). Obtención del vector pcDNA3® hu-C kappa

El vector pcDNA3® hu-C kappa se preparó a partir del vector pcDNA3® KM60C3-L por digestión utilizando las enzimas de restricción BamHI y XhoI. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB2 10X (5 μ L), BSA 100X (0,5 μ L), vector (1 μ g), enzima de restricción BamHI (10 U), enzima de restricción XhoI (10 U). Las enzimas de restricción, las disoluciones tampones de reacción y la disolución de BSA son de New England Biolabs Inc. La reacción se continúa 3 horas en baño maría a 37°C. El vector digerido se purifica gracias al kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. El vector se desfosforila con CIP (New England Biolabs Inc.) durante 1 hora a 37°C. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB3 10X (5 μ L), vector (1 μ g), CIP (1 μ L).

(b). Extracción del ARN total del hibridoma 8B6, productor del anticuerpo monoclonal 8B6.

El ARN total se extrae a partir de 106 células de hibridoma 8B6 en fase exponencial de crecimiento gracias al reactivo RNable (Eurobio, Courtaboeuf, Francia) según las recomendaciones del proveedor. La concentración de ARN total se determina por la medida de la densidad óptica a 260 nm.

(c). Obtención de la secuencia nucleotídica del ADNc 8B6 L-VL

La amplificación génica del ADNc que codifica la región variable 8B6 L-VL se obtuvo a partir de los ARN mensajeros por RACE-PCR de manera que se obtiene la secuencia nucleotídica que codifica el péptido señal (L) asociado a su región variable (VL). Esta amplificación se realizó utilizando el kit SMARTTM RACE Amplificación de ADNc obtenido de la empresa BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU) según las recomendaciones del proveedor. La cantidad de ARN total utilizada para la retrotranscripción es 1 μ g. El producto de la reacción se diluyó en 100 μ L de disolución tampón tricina EDTA suministrada por el proveedor. Un volumen de 2,5 μ L del producto diluido se utilizó para la amplificación génica. El cebador antisentido específico del ADNc 8B6 VL utilizado es el siguiente: 3'-mu C kappa 5'-gtt cat act cgt cct tgg tca acg tga ggg-3' que se hibrida con el ADNc que codifica el dominio constante mu C-kappa de la cadena ligera de los anticuerpos de ratón de tipo kappa. La amplificación se realizó por incubación de la mezcla de reacción en un termociclador Perkin-Elmer (PE) ADN thermal Cyler 480 (Perkin Elmer Wellesley, MA, EEUU) en las condiciones siguientes: 5 ciclos (94°C durante 5 segundos, 72°C durante 3 minutos), seguido de 5 ciclos (94°C durante 5 segundos y 70°C durante 10 segundos seguido de 3 minutos a 72°C) y de 25 ciclos (94°C durante 5 segundos seguido de 69°C durante 10 segundos y 3 minutos a 72°C) y de 25 ciclos (94°C durante 5 segundos seguido de 69°C durante 10 segundos y 3 minutos a 72°C). El producto de la reacción de RACE-PCR se analiza por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Q. Biogene, Morgan Irvine, CA, EEUU) en una disolución tampón de migración de Tris EDTA pH 8 (40 mM Tris-base (Sigma Chemicals Co), 25 mM EDTA (Inerchim, Montluçon, Francia), 20 mM ácido acético (Carlo Erba Reagenti SpA, Ródano, MI, Italia). Los productos con el peso molecular esperado se purifican mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. La determinación de la secuencia de ácido nucleico de los productos purificados obtenidos se realizó por la empresa GENOME exprés (Meylan, Francia) con el fin de verificar la secuencia del ADNc que codifica la región 8B6 L-VL. La secuencia correspondiente al péptido señal asociado con la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 8B6 se determinó así y los cebadores se diseñaron para permitir la clonación del ADNc 8B6 L-VL en el vector de expresión.

(d). Amplificación del ADNc 8B6 L-VL

La amplificación del ADNc 8B6 L-VL se obtuvo por reacción de RT-PCR a partir de un extracto de ARN total de células de hibridoma 60C3. La mezcla de reacción es la siguiente: Oligo d(T)18 0,5 µg (New England Biolabs Inc. Beverly, MA, EEUU), ARN 1 µg, dNTP 0,5 mM (Promega, Madison, WI, EEUU), agua estéril csp 12 µL. Esta mezcla se incubó 5 minutos a 65°C (baño maría seco) y 2 minutos a 4°C (hielo fundente) para desnaturalizar el ARN. Se añaden a la mezcla de reacción, 4 µL de disolución tampón 5X Tampón de Primera cadena (Invitrogen Life Biotechnologies), 10 mM DTT (Invitrogen Life Biotechnologies), 160 U de Rnasina (Promega) y 800 U de transcriptasa inversa (Invitrogen Life Biotechnologies). El conjunto se incubó 1 hora a 37°C y a 70°C durante 15 minutos con el fin de parar la reacción. Las copias de ADNc 8B6 L-VL se obtienen por amplificación génica gracias a una reacción de PCR que utiliza los oligonucleótidos de síntesis que son los siguientes: 5'-BamHI 8B6 L-VL: 5'-aag gga tcc gcc acc atg aag ttg cct gtt-3' (cebador con sentido) y 3'-XhoI 8B6 L-VL: 5'-ccg ttt tat ctc gag ctt ggt ccc-3' (cebador anti-sentido).

Los cebadores de síntesis utilizados permiten la introducción de mutaciones silenciosas en la secuencia de ADN que no implican ninguna modificación a nivel de la secuencia de aminoácidos permitiendo la aparición de los sitios de restricción BamHI y XhoI necesarios para la clonación en el vector.

El medio de reacción tiene la composición siguiente: dNTP (Promega) 500 µM, Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 1 µL, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 µL, ADNc (matriz) 1 µL, MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-XhoI 8B6 L-VL y cebador 5'-BamHI 8B6 L-VL 500 µM.

La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 (Peltier Thermal Cycler) según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C.

Después de la verificación de los productos de PCR por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%, el ADNc 8B6 L-VL se purifica mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor.

(e). Digestión del ADNc 8B6 L-VL

El ADNc 8B6 L-VL se digiere utilizando las enzimas de restricción BamHI y XhoI. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB2 10X (5 µL), BSA 100X (0,5 µL), ADNc 8B6 L-VL (1 µg), enzima de restricción BamHI (10 U), enzima de restricción XhoI (10 U). Las enzimas de restricción, las disoluciones tampones de reacción y la disolución de BSA son de New England Biolabs Inc. La reacción se continúa 3 horas en baño maría a 37°C. El inserto digerido se purifica gracias al kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor.

(f). Reacción de ligación

La ligación permite insertar el ADNc 8B6 L-VL digerido en el vector pcDNA3® hu-C kappa digerido y desfosforilado gracias a la T4 ligasa (New England Biolabs Inc.). La reacción se continúa en baño maría a 16°C durante 16 horas en el medio de reacción siguiente: disolución tampón de ligación 5X (4 µL) (New England Biolabs Inc.), vector pcDNA3® hu-C kappa digerido y desfosforilado 200 ng, T4 ligasa (400 U) (New England Biolabs Inc.), ADNc 8B6 L-VL purificado 170 ng (para un inserto de 1 kb). La relación molar inserto/vector es 3/1. El producto de la reacción de ligación se utiliza para la transformación de bacterias competentes E. coli XL1 blue (Stratagene).

(g). Verificación de la presencia del inserto 8B6 L-VL en el vector pcDNA3® hu-C kappa por reacción de PCR

Las colonias resistentes aisladas se depositan estérilmente en campana en un tubo que contiene la mezcla de reacción de PCR: dNTP (Promega) 500 µM, Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies) 1 µL, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 µL, ADNc (matriz) 1 µL, MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-XhoI 8B6 L-VL y cebador 5'-BamHI 8B6 L-VL 500 µM. La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C. El tamaño del producto de PCR amplificado se controla por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%. Los clones que se han transformado correctamente son los únicos que proporcionan un producto de PCR con el tamaño esperado.

(h). Producción del plásmido de interés pcDNA3® KM8B6 L

Se utiliza un palillo estéril que después de tomar la colonia se pone en 5 mL de medio líquido selectivo LB que contiene 100 µg/mL de ampicilina (Sigma Chemicals Co) y 12,5 µg/mL de tetraciclina (Sigma Chemicals Co) y se incubó 16 horas a 37°C. La dilución bacteriana se utiliza para la realización de una minipreparación de ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN) según las recomendaciones del proveedor.

6. Preparación del ADNc que codifica la región variable L-VH del anticuerpo monoclonal de ratón 60C3

(a). Obtención de la secuencia nucleotídica del ADNc 60C3 L-VH

La amplificación génica del ADNc que codifica la región variable 60C3 L-VH se obtuvo a partir de los ARN mensajeros por RACE-PCR de manera que se obtiene la secuencia nucleotídica que codifica el péptido señal (L) asociado a su región variable (VL). Esta amplificación se realizó utilizando el kit SMARTTM RACE Amplificación de ADNc obtenido de la empresa BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU) según las recomendaciones del proveedor. La cantidad de ARN total utilizada para la retrotranscripción es 1 µg. El producto de la reacción se diluyó en 100 µL de disolución tampón tricina EDTA suministrada por el proveedor. Un volumen de 2,5 µL del producto diluido se utilizó para la amplificación génica. El cebador antisentido específico del ADNc 60C3 VH utilizado es el siguiente: 3'-60C3 L-VH 5'-tgc AGA gac agt gac cag cag agt agt ccc-3' (cebador anti-sentido) que se hibrida con el ADNc que codifica el dominio constante mu C-kappa de la cadena ligera de los anticuerpos de ratón de tipo kappa. La amplificación se realizó por incubación de la mezcla de reacción en un termociclador Perkin-Elmer (PE) DNA thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Wellesley, MA, EEUU) en las condiciones siguientes: 5 ciclos (94°C durante 5 segundos, 72°C durante 3 minutos), seguido de 5 ciclos (94°C durante 5 segundos y 70°C durante 10 segundos seguido de 3 minutos a 72°C) y de 25 ciclos (94°C durante 5 segundos seguido de 69°C durante 10 segundos y 3 minutos a 72°C). El producto de la reacción de RACE-PCR se analiza por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Q. Biogene, Morgan Irvine, CA, EEUU) en una disolución tampón de migración de Tris EDTA pH 8 (40 mM Tris-base (Sigma Chemicals Co), 25 mM EDTA (Inerchim, Montluçon, Francia), 20 mM ácido acético (Carlo Erba Reagenti SpA, Ródano, MI, Italia). Los productos con el peso molecular esperado se purifican mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. La determinación de la secuencia de ácido nucleico de los productos purificados obtenidos se realizó por la empresa GENOME exprés (Meylan, Francia) con el fin de verificar la secuencia del ADNc que codifica la región 60C3 L-VH. La secuencia correspondiente al péptido señal asociado con la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 60C3 se determinó así y los cebadores se diseñaron para permitir la clonación del ADNc 60C3 L-VH en el vector de expresión.

(b). Amplificación del ADNc 60C3 L-VH

La amplificación del ADNc 60C3 L-VH se obtuvo por reacción de RT-PCR a partir de un extracto de ARN total de células de hibridoma 60C3. La mezcla de reacción es la siguiente: Oligo d(T)18 0,5 µg (New England Biolabs Inc. Beverly, MA, EEUU), ARN 1 µg, dNTP 0,5 mM (Promega, Madison, WI, EEUU), agua estéril csp 12 µL. Esta mezcla se incubó 5 minutos a 65°C (baño maría seco) y 2 minutos a 4°C (hielo fundente) para desnaturalizar el ARN. Se añaden a la mezcla de reacción, 4 µL de disolución tampón 5X Tampón de Primera cadena (Invitrogen Life Biotechnologies), 10 mM DTT (Invitrogen Life Biotechnologies), 160 U de Rnasina (Promega) y 800 U de transcriptasa inversa (Invitrogen Life Biotechnologies). El conjunto se incubó 1 hora a 37°C y a 70°C durante 15 minutos con el fin de parar la reacción. Las copias de ADNc 60C3 L-VH se obtienen por amplificación génica gracias a una reacción de PCR que utiliza los oligonucleótidos de síntesis que son los siguientes: 5'-BamHI 60C3 L-VH: 5'-cag gat ccg aac aca ctg act cta acc atg g-3' (cebador con sentido) y 3'-NheI 60C3 L-VH: 5'-t gct agc tgc aga gac agt gac cag agt-3' (cebador anti-sentido).

Los cebadores de síntesis utilizados permiten la introducción de mutaciones silenciosas en la secuencia de ADN que no implican ninguna modificación a nivel de la secuencia de aminoácidos permitiendo la aparición de los sitios de restricción BamHI y XhoI necesarios para la clonación en el vector.

El medio de reacción tiene la composición siguiente: dNTP (Promega) 500 µM, Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 1 µL, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 µL, ADNc (matriz) 1 µL, MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-NheI 60C3 L-VH y cebador 5'-BamHI 60C3 L-VH 500 µM.

La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 (Peltier Thermal Cycler) según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C.

Después de la verificación de los productos de PCR por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%, el ADNc 60C3 L-VH se purifica mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor.

7. Construcción del plásmido recombinante que posee el ADNc 60C3 L-VH

(a). Construcción del vector de clonación pBluescript II SK (+) 60C3 L-VH

Para insertar la secuencia que codifica la región 60C3 L-VH en el vector pBluescript II SK (+), este último se digiere con la enzima de restricción EcoRV (New England Biolabs Inc.) que provoca un corte de extremos libres. El tratamiento del plásmido así linealizado con la Taq polimerasa en presencia de dTTP permite añadir una timidina en el extremo 3' del vector e impide la autoligación. La Taq ADN polimerasa utilizada para la obtención del ADNc 60C3 L-VH posee una actividad exonucleasa 5'-3' añadiendo una adenina terminal a cada extremo 3' de los productos de PCR que pueden clonarse directamente en dicho vector. El rendimiento de la reacción de ligación se mejora en gran medida debido a la complementariedad A/T más allá de la reacción de ligación con extremo libre. El producto de la reacción de ligación se utiliza para la transformación de bacterias competentes E. coli XL1 blue (Stratagene).

(b). Verificación de la presencia del inserto 60C3 L-VH en el vector pBluescript II SK (+) por reacción de PCR

Las colonias resistentes aisladas se depositan estérilmente en campana en un tubo que contiene la mezcla de reacción de PCR: dNTP 500 μ M (Promega), Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies) 1 μ L, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 μ L, $MgCl_2$ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-NheI 60C3 L-VH y cebador 5'-BamHI 60C3 L-VH 500 μ M. La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C. El tamaño del producto de PCR amplificado se controla por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%. Los clones que se han transformado correctamente son los únicos que proporcionan un producto de PCR con el tamaño esperado.

10 (c). Producción del plásmido de interés pBluescript II SK (+) 60C3 L-VH

Para esto, se utiliza un palillo estéril que después de tomar la colonia se pone en 5 mL de medio líquido selectivo LB que contiene 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma Chemicals Co) y 12,5 μ g/mL de tetraciclina (Sigma Chemicals Co) y se incuba 16 horas a 37°C. La dilución bacteriana se utiliza para la realización de una minipreparación de ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN) según las recomendaciones del proveedor.

15 (d). Verificación de la orientación del inserto 60C3 L-VH en el vector pBluescript II SK (+) 60C3 L-VH por digestión enzimática

La presencia del inserto 60C3 L-VH en orientación con sentido se confirma por una digestión enzimática del vector pBluescript II SK (+) 60C3 L-VH con la enzima BamHI (New England Biolabs Inc.) según las recomendaciones del proveedor. En efecto, la técnica de clonación T no impone orientación para el inserto que puede insertarse por lo tanto en orientación con sentido o antisentido. El inserto 60C3 L-VH sólo está enmarcado por dos sitios de restricción BamHI si está en la orientación con sentido. Así, después de la digestión con la enzima BamHI, el análisis electroforético permite distinguir y seleccionar un clon que posee el ADNc 60C3 L-VH en orientación con sentido.

8. Preparación del ADNc que codifica la región constante de un anticuerpo humano hu-C gamma 1

a. Extracción del ARN total de la línea de mieloma humano LP1 productora de una cadena pesada de isotipo gamma 1.

25 El ARN total se extrae a partir de 106 células de hibridoma LP1 en fase exponencial de crecimiento gracias al reactivo RNable (Eurobio, Courtaboeuf, Francia) según las recomendaciones del proveedor. La concentración de ARN total se determina por la medida de la densidad óptica a 260 nm.

b. Amplificación génica del segmento ADNc hu-C gamma 1

30 La amplificación del ADNc hu-C gamma 1 se realizó a partir de un extracto de ARN total del hibridoma LP1. La mezcla de reacción es la siguiente: Oligo d(T)18 0,5 μ g (New England Biolabs Inc. Beverly, MA, EEUU), ARN 1 μ g, dNTP 0,5 mM (Promega, Madison, WI, EEUU), agua estéril csp 12 μ L. Esta mezcla se incuba 5 minutos a 65°C (baño maría seco) y 2 minutos a 4°C (hielo fundente) para desnaturalizar el ARN. Se añaden a la mezcla de reacción, 4 μ L de disolución tampón 5X Tampón de Primera cadena (Invitrogen Life Biotechnologies), 10 mM DTT (Invitrogen Life Biotechnologies), 160 U de Rnasina (Promega) y 800 U de transcriptasa inversa (Invitrogen Life Biotechnologies). El conjunto se incuba 1 hora a 37°C y a 70°C durante 15 minutos con el fin de parar la reacción. Las copias de ADNc hu-C gamma 1 se obtienen por amplificación génica gracias a una reacción de PCR que utiliza los oligonucleótidos de síntesis que son los siguientes: 5'-NheI hu-C gamma 1: 5'-ca gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc c-3' (cebador con sentido) y 3'-XbaI hu-C gamma 1: 5'-agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa tct aga cg-3' (cebador anti-sentido).

40 Los cebadores de síntesis utilizados permiten la introducción de mutaciones silenciosas en la secuencia de ADN que no implican ninguna modificación a nivel de la secuencia de aminoácidos permitiendo la aparición de los sitios de restricción NheI y XbaI necesarios para la clonación en el vector.

El medio de reacción tiene la composición siguiente: dNTP (Promega) 500 μ M, Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 1 μ L, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 μ L, ADNc (matriz) 1 μ L, $MgCl_2$ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-XbaI hu-C gamma 1 y cebador 5'-NheI hu-C gamma 1 500 μ M.

45 La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 (Peltier Thermal Cycler) según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C.

Después de la verificación de los productos de PCR por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%, el ADNc hu-C gamma 1 se purifica mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor.

9. Construcción de un plásmido recombinante que posee el ADNc 60C3 L-VH acoplado al ADNc hu-C gamma 1: pBluescript II SK (+) KM60C3 H

(a). Digestión del vector pBluescript II SK (+) 60C3 L-VH y del ADNc hu-C gamma 1 y desfosforilación del vector digerido

5 La digestión se hace en las condiciones siguientes: tampón NEB2 10X (5 µL), BSA 100X (0,5 µL), vector pBluescript II SK (+) 60C3 L-VH o el ADNc hu-C gamma 1 (1 µg), enzima de restricción NheI (10 U), enzima de restricción XbaI (10 U). Las enzimas de restricción, las disoluciones tampones de reacción y la disolución de BSA son de New England Biolabs Inc. La reacción se continúa 3 horas en baño maría a 37°C. El vector y el inserto digeridos se purifican gracias al kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. El vector se desfosforila con CIP (New England Biolabs Inc.) durante 1 hora a 37°C. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB3 10X (5
10 µL), vector (1 µg), CIP (1 µL).

(b). Reacción de ligación

15 La ligación permite insertar el ADNc hu-C gamma 1 digerido en el vector pBluescript II SK (+) 60C3 L-VH digerido y desfosforilado gracias a la T4 ligasa (New England Biolabs Inc.). La reacción de ligación se continúa en baño maría a 16°C durante 16 horas en el medio de reacción siguiente: disolución tampón de ligación 5X (4 µL) (New England Biolabs Inc.), vector digerido desfosforilado pBluescript II SK (+) 60C3 L-VH 200 ng, T4 ligasa (400 U) (New England Biolabs Inc.), ADNc hu-C gamma 1 purificado 170 ng (para un inserto de 1 kb). La relación molar inserto/vector es 3/1. El producto de la reacción de ligación se utiliza para la transformación de bacterias competentes E. coli XL1 blue (Stratagene).

20 (c). Verificación de la presencia y de la orientación del inserto hu-C gamma 1 en el vector pBluescript II SK (+) 60C3 L-VH por reacción de PCR

25 Debido a la elección de los sitios de restricción NheI y XbaI, el inserto hu-C gamma 1 puede estar en la orientación con sentido o antisentido. Esto se debe a la secuencia de los sitios de restricción que no impone orientación para el inserto. La orientación con sentido del inserto se confirma por una reacción de PCR. Las colonias aisladas se depositan estérilmente respectivamente en campana en un tubo que contiene la mezcla de reacción de PCR: dNTP 500 µM (Promega), Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies) 1 µL, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 µL, MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador con sentido y cebador antisentido 500 µM. La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C. Los cebadores utilizados son: 5'-BamHI 60C3 L-VH: 5'-cag gat ccg aac aca ctg act cta acc atg g-3' (cebador con sentido) y 3'-XbaI hu-C gamma 1: 5'-agc ctc tcc ctg tct
30 ccg ggt aaa taa tct aga cg-3' (cebador anti-sentido).

Si el inserto no está en la buena orientación, los cebadores se encuentran en la misma cadena de la secuencia a amplificar y no hay por lo tanto amplificación. El tamaño del producto de PCR amplificado se controla por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%. Los clones que se han transformado correctamente son los únicos que proporcionan un producto de PCR con el tamaño esperado.

35 (d). Producción del plásmido de interés pBluescript II SK (+) KM60C3 H

Se utiliza un palillo estéril que después de tomar la colonia se pone en 5 mL de medio líquido selectivo LB que contiene 100 µg/mL de ampicilina (Sigma Chemicals Co) y 12,5 µg/mL de tetraciclina (Sigma Chemicals Co) y se incuba 16 horas a 37°C. La dilución bacteriana se utiliza para la realización de una minipreparación de ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN) según las recomendaciones del proveedor.

40 10. Construcción del vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo modificado artificialmente KM 8B6: pcDNA3/Hygro 8B6-H

(a). Obtención del vector pBluescript II SK (+) hu-C gamma 1

45 El vector pBluescript II SK (+) hu-C gamma 1 se preparó a partir del vector pBluescript II SK (+) KM60C3 H por digestión utilizando las enzimas de restricción BamHI y XbaI. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB2 10X (5 µL), BSA 100X (0,5 µL), vector (1 µg), enzima de restricción BamHI (10 U), enzima de restricción XbaI (10 U). Las enzimas de restricción, las disoluciones tampones de reacción y la disolución de BSA son de New England Biolabs Inc. La reacción se continúa 3 horas en baño maría a 37°C. El vector se purifica gracias al kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. El vector se desfosforila con CIP (New England Biolabs Inc.) durante 1 hora a 37°C. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB3 10X (5 µL), vector (1 µg),
50 CIP (1 µL).

(b). Extracción del ARN total del hibridoma 8B6 productor del anticuerpo monoclonal 8B6.

El ARN total se extrae a partir de 106 células de hibridoma 8B6 en fase exponencial de crecimiento gracias al reactivo RNable (Eurobio, Courtaboeuf, Francia) según las recomendaciones del proveedor. La concentración de ARN total se determina por la medida de la densidad óptica a 260 nm.

5 (c). Obtención de la secuencia nucleotídica del ADNc 8B6 L-VH

La amplificación génica del ADNc que codifica la región variable 8B6 L-VH se obtuvo a partir de los ARN mensajeros por RACE-PCR de manera que se obtiene la secuencia nucleotídica que codifica el péptido señal (L) asociado a su región variable (VH). Esta amplificación se realizó utilizando el kit SMART RACE Amplificación de ADNc obtenido de la empresa BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU) según las recomendaciones del proveedor. La cantidad de ARN total utilizada para la retrotranscripción fue 1 µg. El producto de la reacción se diluyó en 100 µL de disolución tampón tricina EDTA suministrada por el proveedor. Un volumen de 2,5 µL del producto diluido se utilizó para la amplificación génica. El cebador antisentido específico del ADNc 8B6 L-VH utilizado es el siguiente: 3'-mu C gamma 3 5'-tga tca act cag tct tgc tgg ctg ggt ggg-3' que se hibrida con el ADNc que codifica el dominio constante mu C-gamma 3 de la cadena pesada de los anticuerpos de ratón de tipo gamma 3. La amplificación se realizó por incubación de la mezcla de reacción en un termociclador Perkin-Elmer (PE) DNA thermal Cyclor 480 (Perkin Elmer Wellesley, MA, EEUU) en las condiciones siguientes: 5 ciclos (94°C durante 5 segundos, 72°C durante 3 minutos), seguido de 5 ciclos (94°C durante 5 segundos y 70°C durante 10 segundos seguido de 3 minutos a 72°C) y de 25 ciclos (94°C durante 5 segundos seguido de 69°C durante 10 segundos y 3 minutos a 72°C). El producto de la reacción de RACE-PCR se analiza por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Q. Biogene, Morgan Irvine, CA, EEUU) en una disolución tampón de migración de Tris EDTA pH 8 (40 mM Tris-base (Sigma Chemicals Co), 25 mM EDTA (Inerchim, Montluçon, Francia), 20 mM ácido acético (Carlo Erba Reagenti SpA, Ródano, MI, Italia). Los productos con el peso molecular esperado se purifican mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. La determinación de la secuencia de ácido nucleico de los productos purificados obtenidos se realizó por la empresa GENOME exprés (Meylan, Francia) con el fin de verificar la secuencia del ADNc que codifica la región 8B6 L-VH. La secuencia correspondiente al péptido señal asociado con la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 8B6 se determinó así y los cebadores se diseñaron para permitir la clonación del ADNc 8B6 L-VH en el vector de expresión pBluescript II SK (+) hu-C gamma 1.

(d). Amplificación génica de los segmentos 8B6 L-VH

La amplificación del ADNc 8B6 L-VH se obtuvo por reacción de RT-PCR a partir de un extracto de ARN total de células de hibridoma 8B6. La mezcla de reacción es la siguiente: Oligo d(T)18 1 µL (New England Biolabs Inc. Beverly, MA, EEUU), ARN 1 µg, dNTP 0,5 mM (Promega, Madison, WI, EEUU), agua estéril csp 12 µL. Esta mezcla se incubó 5 minutos a 65°C (baño maría seco) y 2 minutos a 4°C (hielo fundente) para desnaturalizar el ARN. Se añaden a la mezcla de reacción, 4 µL de disolución tampón 5X Tampón de Primera cadena (Invitrogen Life Biotechnologies), 10 mM DTT (Invitrogen Life Biotechnologies), 160 U de Rnasina (Promega) y 800 U de transcriptasa inversa (Invitrogen Life Biotechnologies). El conjunto se incubó 1 hora a 37°C y a 70°C durante 15 minutos con el fin de parar la reacción. Las copias de ADNc 8B6 L-VH se obtienen por amplificación génica gracias a una reacción de PCR que utiliza los oligonucleótidos de síntesis siguientes: 5'-BamHI 8B6 L-VH: 5'-ccg tcg gat ccg gcc acc atg aag ttg tgg-3' (cebador con sentido) y 3'-NheI 8B6 L-VH: 5'-cgg ggt gct agc tga gga gac tgt-3' (cebador anti-sentido).

Los cebadores utilizados permiten la introducción de mutaciones silenciosas en la secuencia de ADN que no implican ninguna modificación a nivel de la secuencia de aminoácidos permitiendo la aparición de los sitios de restricción BamHI y NheI necesarios para la clonación en el vector.

El medio de reacción tiene la composición siguiente: dNTP 500 µM (Promega), Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies), 1 µL, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 µL, ADNc (matriz) 1 µL, MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3'-NheI 8B6 L-VH y cebador 5'-BamHI 8B6 L-VH 500 µM.

La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 (Peltier Thermal Cyclor) según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C.

Después de la verificación de los productos de PCR por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%, el ADNc 8B6 L-VH se purifica mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor.

(e). Digestión del ADNc 8B6 L-VH

El ADNc de 8B6 L-VH se digiere utilizando las enzimas de restricción BamHI y NheI. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB2 10X (5 µL), BSA 100X (0,5 µL), ADNc 8B6 L-VH (1 µg), enzima de restricción BamHI (10 U), enzima de restricción NheI (10 U). Las enzimas de restricción, las disoluciones tampones de reacción y la

disolución de BSA son de New England Biolabs Inc. La reacción se continúa 3 horas en baño maría a 37°C. El inserto digerido se purifica gracias al kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor.

(f). Reacción de ligación

5 La ligación permite insertar el ADNc 8B6 L-VH digerido en el vector pBluescript II SK (+) hu-C gamma 1 digerido y desfosforilado. La reacción se continúa en baño maría a 16°C durante 16 horas en el medio de reacción siguiente: disolución tampón de ligación 5X (4 µL) (New England Biolabs Inc.), vector digerido desfosforilado pBluescript II SK (+) hu-C gamma 1 200 ng, T4 ligasa (400 U) (New England Biolabs Inc.), ADNc 8B6 L-VH purificado 170 ng (para un inserto de 1 kb). La relación molar inserto/vector es 3/1. El producto de la reacción de ligación se utiliza para la transformación de bacterias competentes E. coli XL1 blue (Stratagene).

10 (g). Obtención del ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo modificado artificialmente

El vector pBluescript II SK (+) KM8B6 H se digiere con las enzimas de restricción BamHI y XbaI para obtener el ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo modificado artificialmente. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB2 10X (5 µL), BSA 100X (0,5 µL), vector (1 µg), enzima de restricción BamHI (10 U), enzima de restricción XbaI (10 U). Las enzimas de restricción, las disoluciones tampones de reacción y la disolución de BSA son de
15 New England Biolabs Inc. La reacción se continúa 3 horas en baño maría a 37°C. El inserto liberado se purifica gracias al kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor.

(h). Digestión del vector pcDNA3/Hygro y desfosforilación del vector digerido

20 La digestión se hace en las condiciones siguientes: tampón NEB2 10X (5 µL), BSA 100X (0,5 µL), vector (1 µg), enzima de restricción BamHI (10 U), enzima de restricción XbaI (10 U). Las enzimas de restricción, las disoluciones tampones de reacción y la disolución de BSA son de New England Biolabs Inc. La reacción se continúa 3 horas en baño maría a 37°C. El vector y el inserto digeridos se purifican gracias al kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) según las recomendaciones del proveedor. El vector se desfosforila con CIP (New England Biolabs Inc.) durante 1 hora a 37°C. La composición del medio de reacción es la siguiente: tampón NEB3 10X (5 µL), vector (1 µg), CIP (1 µL).

(i). Reacción de ligación

25 La reacción de ligación permite insertar el ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo modificado artificialmente en el vector pcDNA3/Hygro digerido y desfosforilado. La reacción de ligación se continúa en baño maría a 16°C durante 16 horas en el medio de reacción siguiente: disolución tampón de ligación 5X (4 µL) (New England Biolabs Inc.), vector digerido desfosforilado pcDNA3/Hygro 200 ng, T4 ligasa (400 U) (New England Biolabs Inc.), el ADNc que codifica la
30 cadena pesada del anticuerpo modificado artificialmente purificado 170 ng (para un inserto de 1 kb). La relación molar inserto/vector es 3/1. El producto de la reacción de ligación se utiliza para la transformación de bacterias competentes E. coli XL1 blue (Stratagene).

(j). Verificación de la presencia del ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo modificado artificialmente en el vector pcDNA3/Hygro por reacción de PCR

35 Las colonias resistentes aisladas se depositan estérilmente en campana en un tubo que contiene la mezcla de reacción de PCR: dNTP 500 µM (Promega), Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies) 1 µL, disolución tampón de PCR (Invitrogen Life Technologies) 10 µL, MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies) 1,5 mM, cebador 3' y cebador 5' 500 µM. La amplificación se realizó en un termociclador MJ-research PTC 200 según las condiciones siguientes: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos siguientes 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C. Los cebadores utilizados son: 5'-
40 BamHI 60C3 L-VH: 5'-ccg tcg gat ccg gcc acc atg aag ttg tgg-3' (cebador con sentido) y 3'-NheI 8B6 L-VH: 5'-cgg ggt gct agc tga gga gac tgt-3' (cebador antisentido).

El tamaño del producto de PCR amplificado se controla por análisis electroforético en gel de agarosa al 1%. Los clones que se han transformado correctamente son los únicos que proporcionan un producto de PCR con el tamaño esperado.

(k). Producción del plásmido de interés pcDNA3 KM8B6 L

45 Se utiliza un palillo estéril que después de tomar la colonia se pone en 5 mL de medio líquido selectivo LB que contiene 100 µg/mL de ampicilina (Sigma Chemicals Co) y 12,5 µg/mL de tetraciclina (Sigma Chemicals Co) y se incuba 16 horas a 37°C. La dilución bacteriana se utiliza para la realización de una minipreparación de ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN) según las recomendaciones del proveedor.

11. Transfección de las células CHO para la expresión del anticuerpo modificado artificialmente KM8B6

Las células CHO se utilizaron como células huésped para expresar y secretar el anticuerpo modificado artificialmente KM8B6. Estas células se co-transfectaron con los plásmidos pDNA3[®] KM8B6-L y pDNA3.1/Hygro[®] KM8B6-H, que codifican respectivamente la cadena ligera (Figura 4) y la cadena pesada del anticuerpo modificado artificialmente KM8B6 (Figura 9), mediante el kit PolyFect[®] (Qiagen GmbH, Hildn, Alemania) según las recomendaciones del proveedor. Las células transformadas se seleccionaron por su resistencia a la geneticina[®] y la higromicina B[®] (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Los clones resistentes se obtuvieron por una técnica clásica de clonación por dilución limitada. Se seleccionaron por su expresión y su secreción del anticuerpo KM8B6 por un ensayo inmuno-enzimático ELISA. Se retuvo un clon transfectante estable que secreta el anticuerpo KM8B6 a 3,8 µg/mL.

12. Purificación de los anticuerpos 8B6 y KM8B6

Los anticuerpos monoclonales de ratón específicos de los gangliósidos se produjeron a partir del sobrenadante del cultivo del hibridoma correspondiente (Cerato et al., 1997). Se purificaron por cromatografía en proteína A (GE Healthcare Amersham Bioscience AB, Uppsala, Suecia) según un protocolo puesto a punto por el inventor que limita los fenómenos de agregaciones homófilas irreversibles de las IgG3 de ratón (Chapman et al., 1990). La columna se equilibra previamente con un tampón 0,1 M Tris-HCl pH 7,6. Una muestra de 2 L de sobrenadante del cultivo que contiene 10% de tampón de equilibrado se deposita en la columna con un caudal de 1 mL/min. La columna se lava con 10 volúmenes de tampón de equilibrado. El material fijado a la proteína A se eluye con un tampón ácido 0,1 M citrato 0,3 M NaCl pH 3 y se recoge por fracciones inmediatamente neutralizadas por el depósito previo en tubos colectores de un tampón 1 M Tris-HCl pH 7,6. El desarrollo de la purificación se sigue por la medida de la variación de la densidad óptica de las fracciones recogidas. Las fracciones interesantes se dializan en una disolución de PBS pH 7,4 NaCl 0,3 M y se esterilizan por filtración en un filtro de 0,22 µm. La cantidad de proteína se determina por la medida de la densidad óptica a 280 nm y la concentración del AcM se ajusta a una concentración inferior o igual a 0,9 mg de AcN por mL de forma que se evita el fenómeno de agregación homófila de las IgG3 de ratón. Los AcM purificados se conservan así a 4°C hasta su utilización.

El anticuerpo modificado artificialmente KM8B6 se purificó por cromatografía de afinidad en proteína A a partir del sobrenadante del cultivo de células CHO que provienen de un clon co-transfectado de manera estable con los plásmidos pcDNA3 KM8B6-L y pcDNA3/Hygro KM8B6-H.

Los anticuerpos purificados se analizan por análisis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes reductoras. Las muestras se recogen en una disolución tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, que contiene 10% glicerol (VWR, Fontenay sous Bois, Francia) y 5% de B-mercaptoetanol (Promega). Se llevan a ebullición 5 minutos y se analizan en electroforesis SDS-PAGE según la técnica de Laemmli. Las proteínas se depositan a razón de 3 µg en los pocillos de un gel de poliacrilamida de 1,5 mm de espesor con las concentraciones respectivas de poliacrilamida para el gel superior e inferior de 4,5% y 12% (VWR). Después de la electroforesis a 200 V durante 45 minutos a temperatura ambiente, el gel se fija y se tiñe con azul de Coomassie R250 (Sigma Chemicals Co). Las masas moleculares se calculan a partir de la migración del marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (BIORAD).

El análisis SDS-PAGE en gel al 12% en condiciones desnaturalizantes reductoras muestra que las masas moleculares de las cadenas quiméricas L y H son respectivamente 25 kDa y 50 kDa. El análisis SDS-PAGE en gel al 6% en condiciones desnaturalizantes no reductoras muestra que las cadenas L y H están ensambladas correctamente para formar una molécula de anticuerpo y que la masa molecular del anticuerpo modificado artificialmente es del orden de 150 kDa.

13. Estudio de la especificidad del anticuerpo KM8B6

(a). por inmunofluorescencia indirecta en células vivas

La especificidad de los anticuerpos se estudió en las células IMR32 que expresan el GD2-O-acetilado y en las células Neuro 2A que no expresan el GD2-O-acetilado. Se incuban 10⁶ células con el anticuerpo 8B6 o KM8B6 durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavan dos veces en tampón PBS-BSA 1% pH 7,4 y se incuban de nuevo 30 minutos en presencia del anticuerpo de cabra F(ab)₂ anti-inmunoglobulinas de ratón o anti-inmunoglobulinas humanas marcados con isotiocianato de fluoresceína (Jackson ImmunoResearch Europa Ltd, Cambridgeshire, Reino Unido) diluidos a 1/100 en PBS-BSA 1%. Después de tres nuevos lavados en PBS, 10.000 células se analizan mediante un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dockinson, Mountain View, CA) en una ventana SSC/FL1-H con exclusión de las células muertas y los restos celulares. Se declaran positivas las células que presentan una fluorescencia superior a 1 Log después de ajustar la base mediante testigos marcados no específicamente con el segundo anticuerpo solo.

Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo KM8B6, como el anticuerpo 8B6, reconoce únicamente las células IMR32.

(b). por ensayo inmuno-enzimático ELISA en células desecadas en placa de microtitulación de 96 pocillos.

La especificidad de los anticuerpos se estudió en las células IMR32 que expresan el GD2-O-acetilado y en las células Neuro 2A que no expresan el GD2-O-acetilado. Las células tumorales cultivadas in vitro se despegan de su soporte de cultivo por tratamiento con tripsina. Después de tres lavados de PBS, las células se distribuyen en placas de microtitulación con fondo plano Maxisorp (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) a razón de 105 células por pocillo en un volumen de 50 μ L de PBS. Las placas se ponen en una estufa a 37°C durante una noche para permitir la evaporación del PBS. Las placas pueden utilizarse directamente o conservarse durante varios meses a temperatura ambiente antes de su utilización. En el momento del análisis, las placas se incuban en primer lugar con agitación una hora a temperatura ambiente con 200 μ L de una disolución tampón de PBS pH 7,4 que contiene 1% de BSA con el fin de saturar los sitios no específicos. La placa se incuba durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente con 100 μ L de una disolución del anticuerpo diluido en tampón PBS con 0,1% de BSA. Después de tres lavados, cada uno efectuado con 200 μ L de tampón PBS, se depositan en cada pocillo 100 μ L de una disolución de anticuerpos F(ab')₂ biotinilados específicos bien de inmunoglobulinas totales de ratón, bien de inmunoglobulinas totales humanas (Jackson ImmunoResearch Europe LTD, Cambridgeshire, Reino Unido) diluidos 1/2.500 en PBS-BSA 0,1%. Después de 1 hora de incubación con agitación a temperatura ambiente y de tres lavados en PBS, se hace reaccionar una disolución de estreptavidina peroxidasa biotinilada (Jackson ImmunoResearch Europe LTD, Cambridgeshire, Reino Unido) en PBS-BSA 0,1% durante 1 hora antes de eliminarla por lavado. El revelado del complejo fijado se pone de manifiesto por adición de 100 μ L de sustrato ABTS (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Alemania). La densidad óptica se determina por una lectura de la placa en espectrofotómetro (Multisan EX, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) a 405 nm a diferentes intervalos de tiempo.

Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo KM8B6, como el anticuerpo 8B6, se fija de manera dependiente de la dosis exclusivamente a las células IMR32.

(c). en capa fina de sílice

El análisis se realizó sobre un extracto gangliosídico total de células IMR32. Los gangliósidos tisulares se extraen según la técnica descrita por Ariga et al. (1991). La muestra a extraer se tritura en diez volúmenes de una mezcla cloroformo/metanol (C:M) (1:1, v/v) y se deja con agitación mecánica a temperatura ambiente durante una noche. Después de filtrar, el residuo se recoge en 2,5 volúmenes (C:M) (1:1, v/v) y se agita de nuevo durante seis horas. La mezcla se filtra y los dos filtrados se evaporan bajo presión reducida en un evaporador giratorio. El residuo seco se deposita en una columna que contiene 2 mL de DEAE-Sefadex A-25 en forma acetato (Sigma Chemicals Co). Los lípidos neutros se eliminan con 15 mL de disolvente A. Los gangliósidos se eluyen con 15 mL de metanol que contiene 0,4 M de acetato de sodio (Sigma Chemicals Co). A la fracción obtenida se le añaden 30 mL de PBS pH 7,4 para desalarla en una columna Sep-Pak (Waters Co., Milford, MA, EEUU) de gel hidrófobo C18 según el método de Mc Luer (1990). El gel C18 se acondiciona en primer lugar con dos volúmenes de columna de metanol y mezcla metanol/PBS 1:2 (v/v). El extracto a desalar se deposita en la columna con una velocidad de 1 mL/min. Las cadenas hidrocarbonadas de los gangliósidos interaccionan con uniones hidrófobas con el gel mientras que las sales y las demás moléculas no hidrófobas son eliminadas con dos volúmenes de columna de agua destilada. Los glicosíngolípidos se eluyen con un volumen de metanol y un volumen de una mezcla cloroformo/metanol 2:1 (v/v). Los gangliósidos eluidos de esta columna se concentran en un nuevo volumen adecuado de una mezcla C/M 2:1 (v/v) y se conservan a -20°C.

Los gangliósidos se separan por cromatografía en capa fina. Este método permite apreciar el perfil de los gangliósidos totales. Las placas HPTLC están constituidas por un gel de sílice 60 (Merck) que recubre una hoja de aluminio. Los gangliósidos depositados migran 20 minutos a temperatura ambiente en una cubeta saturada en disolvente de migración. Este disolvente (fase móvil) está constituido por una mezcla C/M/CaCl₂ en agua 0,22% (50:45:10, v/v/v). Cuanto más sialilado esté un gangliósido será más polar y menos móvil. La detección de los gangliósidos en la placa se realiza químicamente con el reactivo resorcinol/HCl (Svennerholm, 1963). Este reactivo sólo reacciona con el ácido siálico que es característico de los gangliósidos. Después del revelado con resorcinol, se observan varias bandas teñidas correspondientes a la migración de los gangliósidos del extracto total. La identificación de los gangliósidos separados se realiza bien mediante anticuerpos monoclonales específicos, bien por comparación con gangliósidos estándares utilizados como marcadores que han migrado en el mismo tiempo que el extracto gangliosídico a analizar.

Después de la migración de los gangliósidos en una capa fina de sílice, la placa se sumerge en una disolución de poli-(isobutil)-metacrilato 0,01% en hexano durante 1 minuto y se seca al aire. Esto permite plastificar la placa y evitar que el gel se despegue de su soporte durante las etapas posteriores. El protocolo del ensayo ELISA en células desecadas se sigue con la excepción de que el revelado de la fijación del anticuerpo al gangliósido se efectúa con una disolución de 4-cloro-1-naftol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Stenheim, Alemania) preparada extemporáneamente a razón de 1 mg de producto disuelto en 1 mL de metanol, se recoge en 20 mL de PBS y se le añaden 30 μ L de agua oxigenada 30 volúmenes.

Los resultados muestran que el anticuerpo KM8B6, como el anticuerpo 8B6, reconoce el GD2-O-acetilado únicamente en ausencia de tratamiento alcalino del extracto gangliosídico.

14. Estudio de la distribución del gangliósido GD2 y de su forma O-acetilada en el sistema nervioso y en tejidos tumorales

5 Las muestras de tumores (glioblastoma, neuroblastoma, melanoma, cáncer pulmonar) se obtuvieron a partir de ablación quirúrgica. Las muestras de nervios periféricos humanos se tomaron sobre la rama sensitiva distal del nervio músculo-cutáneo, rama lateral del nervio peroneo. Se trata de tomas diagnósticas de neuropatía periférica o para afecciones de la córnea anterior (nervios sensitivos normales) que han planteado problemas diagnósticos. Un volumen de tejidos que no pasa de $0,5 \text{ cm}^3$ se toma y se congela en isopentano enfriado a la temperatura del nitrógeno líquido. Después de 60 segundos, la muestra se retira y se transfiere a un tubo de congelación enfriado previamente a -70°C . Se realizan cortes de $10 \mu\text{m}$ del tejido congelado mediante un criostato. Los cortes se recogen en láminas de vidrio Suoerforst Gold + (VWR). Los cortes se secan al aire durante 3 minutos, se fijan en acetona durante 10 minutos y se secan de nuevo al aire. Los cortes se conservan a -20°C hasta la realización del análisis inmunohistoquímico. La inmunotinción de las muestras tisulares se realizó utilizando los AcM de ratón primarios siguientes:

Anticuerpo primario específico de GD2:

AcM 10B8 (IgG3, kappa) específico de GD2

15 AcM 8B6 (IgG3, kappa) específico de GD2-O-Ac

Anticuerpo primario que sirve de reactivo de testigo negativo: AcM MCA2063 (IgG3, kappa) específico de DNP (Serotec France, Cergy Saint Christophe, Francia).

20 El revelado de la fijación de estos anticuerpos sobre las muestras tisulares ensayadas se efectuó mediante el kit DakoCytomation + sistema Peroxidasa HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca) para un uso con los anticuerpos primarios de ratón según las recomendaciones del proveedor. Las muestras se montan entre láminas y laminillas con un medio de montaje acuoso Aquadex (VWR). La investigación del marcaje se realiza por análisis de microscopía óptica mediante un microscopio óptico con aumento 100 y 400. Se analizaron las microfotografías numéricas de tres campos microscópicos elegidos al azar por muestra.

25 Las muestras tumorales, que provienen de pacientes diferentes, presentaron todas un marcaje positivo, membranario y citoplásmico, con los anticuerpos 10B8 y 8B6 mientras que las células sanas no se marcaron con ninguno de estos dos anticuerpos. No se detectó ningún marcaje con el anticuerpo MCA2063 anti-DNP.

30 Las muestras de nervios examinadas presentaron todas un marcaje a nivel de los internodos de las fibras mielinizadas con el anticuerpo 10B8 mientras que los axones y los fibroblastos no presentaron marcaje. Este marcaje no se encontró o fue difícilmente detectable con el anticuerpo 8B6. No se puso de manifiesto ningún marcaje con el anticuerpo MCA2063.

15. Estudio de la citotoxicidad de los anticuerpos anti-GD2-O-acetilado 8B6 y KM8B6

(a). Preparación de la suspensión de células diana.

35 Se incuban 1×10^6 células de neuroblastoma humano IMR32 cultivadas en medio RPMI en presencia de $1,85 \text{ MBq}$ de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ durante 1 hora a 37°C . Las células se lavan tres veces con RPMI y se centrifugan antes de resuspenderlas en RPMI y se incuban a 4°C durante 30 minutos con el fin de medir la liberación espontánea de la sustancia radiactiva.

Después de una última centrifugación, las células se recogen en 5 mL de RPMI con el fin de ajustar la concentración a 2×10^5 células/mL.

(b). Preparación de las células efectoras

40 Se extrajo sangre humana de donantes voluntarios en tubos de extracción sanguínea que contienen heparina. Los leucocitos de sangre periférica se separaron de la sangre total en un gradiente de Ficoll® por centrifugación ($1.800 \times g$ durante 30 minutos). Las células obtenidas se centrifugan tres veces en RPMI a $1.500 \times g$ para lavado y se resuspenden en RPMI con el fin de obtener una concentración de células de 5×10^6 células/mL.

(c). Medida de la actividad ADCC

45 En cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo en U, obtenida de la empresa Falcon, se depositan $50 \mu\text{L}$ de suspensión de células diana, obtenidas en a. Se añaden $100 \mu\text{L}$ de la suspensión de células efectoras, obtenidas en b, es decir 50.000 células por pocillo. La relación de células diana respecto al número de células efectoras es 1/50. El anticuerpo 8B6 y el anticuerpo modificado artificialmente KM8B6 y rituxan®, anticuerpo anti-CD20 utilizado como control negativo) se añaden en cada pocillo a la concentración de $1 \mu\text{g/mL}$

o de 10 µg/mL. La mezcla se incuba 4 horas a 37⁰C. Después de centrifugar, la placa se centrifuga y la cantidad de ⁵¹Cr presente en el sobrenadante se mide mediante un contador γ. La cantidad total de ⁵¹Cr liberado se mide según el mismo procedimiento añadiendo medio sin anticuerpo y una disolución de sosa 5 N en lugar de la suspensión de células efectoras. ADCC se calcula utilizando la fórmula siguiente:

$$5 \quad \% \text{ de actividad ADCC} = \frac{(^{51}\text{Cr presente en el sobrenadante} - ^{51}\text{Cr liberado espontáneamente})}{(^{51}\text{Cr total} - ^{51}\text{Cr liberado espontáneamente})}$$

16. Actividad tumoral del anticuerpo 8B6 en un modelo singénico de linfoma de ratón

La actividad anti-tumoral del anticuerpo 8B6 se determinó en el modelo de injerto subcutáneo singénico de linfoma T de ratón EL-4, que expresa el antígeno GD2, en el ratón de la cepa C57BL/6 (Zhang H, Zhang S, Cheung NK, Ragupathi G, Livingston PO. Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases. Cancer Res. 1998, 58: 2844-9). Estas células EL4 expresan igualmente el antígeno GD2-O-acetilado. Veinticuatro ratones criados en animalario exclusivo de nivel A1 recibieron una inyección subcutánea de 20x10⁴ células EL-4 en suspensión en PBS, a la edad de 12 semanas. Se constituyeron dos lotes de 12 ratones. Los ratones del lote A recibieron 70 µg de AcM 8B6 en disolución en 200 µL de disolución tampón PBS por vía i.v., cada 3 días a partir del primer día después de la inyección de las células EL-4 y hasta el día 21. Los ratones del lote B recibieron, según las mismas modalidades, únicamente 200 µL de disolución PBS. El volumen de los tumores se midió cada dos días. El volumen tumoral se estimó gracias a la fórmula siguiente: volumen (mm³) = longitud (mm) x anchura² (mm) x 0,5 (Zeng G, Li DD, Gao L, Birkle S, Bieberich E, Tokuda A, Yu RK. Alteration of ganglioside composition by stable transfection with antisense vectors against GD3-synthase gene expression. Biochemistry 1999 38: 8762-9). Los ratones que presentan un volumen ≥ 3.000 mm³ se sacrifican.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 16. El lote B que recibe el PBS por vía i.v., corresponde al lote testigo no tratado (Figura 16, panel B). Los tumores comienzan a ser detectables 10 días después de la inoculación y muestran un crecimiento exponencial. Veinte días después de la inoculación, todos los ratones salvo dos tienen un tumor de más de 1.000 mm³. Todos los ratones se sacrificaron antes del día 30 según las reglas de experimentación animal porque su tumor pasaba de 3.000 mm³. En los ratones del lote A, tratados con el anticuerpo 8B6 (Figura 16, panel A), se observa un retraso en la aparición de los tumores. Además, el crecimiento tumoral se ralentiza en los ratones que han recibido este anticuerpo. Veinte días después de la inoculación, ninguno de los ratones tratados tiene un tumor de más de 1.000 mm³. Al cabo de 30 días, 58% de los ratones tratados con el AcM 8B6 sobreviven mientras que todos los ratones no tratados mueren. Al cabo de 40 días, 25% de los ratones tratados todavía viven y en el día 50, 8% de los ratones todavía viven y no presentan tumores palpables y se consideran como curados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Nantes

5 <120> Utilización de anticuerpos monoclonales específicos de la forma O-acetilada del gangliósido GD2 en el tratamiento de determinados cánceres

<130> R11732FR

10 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 137

<212> PRT

<213> ratón

<400> 1

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

Phe Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu
20 25 30

Pro Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Glu Phe Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Arg Lys Ala Leu
50 55 60

Glu Trp Leu Gly Phe Ile Arg Asn Arg Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu
65 70 75 80

Tyr Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Gln Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ser Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Ser Asn Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

20 Gln Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
130 135

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

25 <213> ratón

<400> 2

Glu Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ratón
 5
 <400> 3
 Ile Arg Asn Arg Ala Asn Gly Tyr Thr Thr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ratón
 10
 <400> 4
 Ala Arg Val Ser Asn Trp Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10
 15
 <210> 5
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> ratón
 20
 <400> 5
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Leu Lys Asn Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Ser
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ser Gln Ser Thr His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 25
 Glu Leu Lys Arg Thr
 130

ES 2 392 631 T3

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> ratón
5
<400> 6
Gln Ser Leu Leu Lys Asn Asn Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10
10
<210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> ratón
<400> 7
Lys Val Ser
1
15
<210> 8
<211> 9
<212> PRT
20 <213> ratón
<400> 8
Ser Gln Ser Thr His Ile Pro Tyr Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que reconoce el gangliósido GD2-O-acetilado y no reconoce el gangliósido GD2 para la utilización en el tratamiento de los cánceres que expresan el GD2-O-acetilado, principalmente los tumores de origen neuroectodérmico que expresan el GD2 y su forma O-acetilada.
- 5 2. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1 caracterizado porque el anticuerpo que sólo reconoce la forma O-acetilada del gangliósido GD2 es una IgG kappa con una afinidad superior a 10^7 litros/mol para el GD2-O-acetilado y una afinidad al menos diez veces más baja para el GD2 en sí mismo.
3. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1 caracterizado porque el anticuerpo que sólo reconoce la forma O-acetilada del gangliósido GD2 es un anticuerpo monoclonal o fragmento de este anticuerpo.
- 10 4. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 2 caracterizado porque determinados aminoácidos del anticuerpo que sólo reconoce la forma O-acetilada del gangliósido GD2 han sido reemplazados por otros utilizando las técnicas de genética molecular conocidas por el experto en la técnica, principalmente para modificar las propiedades del anticuerpo original, en particular para disminuir su inmunogenicidad, o para aumentar su actividad tóxica o también para acelerar o ralentizar su eliminación después de la inyección.
- 15 5. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 4, caracterizado porque dicho anticuerpo presenta un poder citotóxico aumentado y porque está poco fucosilado.
6. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 2 caracterizado porque el anticuerpo que sólo reconoce la forma O-acetilada del gangliósido GD2 es el anticuerpo 8B6 en el que las regiones que determinan la complementariedad de la región variable de la cadena H tienen como secuencias de aminoácidos las representadas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y las regiones que determinan la complementariedad de la región variable de la cadena L tienen como secuencias de aminoácidos las representadas en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
- 20 7. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 2 caracterizado porque el anticuerpo que sólo reconoce la forma O-acetilada del gangliósido GD2 es un anticuerpo quimérico o fragmento de éste.
8. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 2 caracterizado porque el anticuerpo que sólo reconoce la forma O-acetilada del gangliósido GD2 es un anticuerpo humanizado o fragmento de éste.
- 25 9. Anticuerpo para la utilización según una de las reivindicaciones 6, 7 u 8 caracterizado porque el anticuerpo que sólo reconoce la forma O-acetilada del gangliósido GD2 es un anticuerpo quimérico o humanizado en el que las regiones que determinan la complementariedad de la región variable de la cadena H tienen como secuencias de aminoácidos las representadas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y las regiones que determinan la complementariedad de la región variable de la cadena L tienen como secuencias de aminoácidos las representadas en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
- 30 10. Anticuerpo para la utilización según las reivindicaciones 1 a 9 caracterizado porque dichos cánceres son neuroblastomas, melanomas, glioblastomas o cánceres pulmonares de células pequeñas.
11. Anticuerpo para la utilización según las reivindicaciones 1 a 9 caracterizado porque el anticuerpo o fragmento de éste está acoplado con una molécula X, en la que X es una molécula tóxica, un medicamento, un pro-fármaco o un segundo anticuerpo sea cual sea su especificidad.
- 35 12. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 11 caracterizado porque dicha molécula tóxica es una molécula tóxica química, biológica o radiactiva, estando destinada dicha molécula a destruir las células tumorales que expresan el gangliósido GD2-O-acetilado.
- 40 13. Anticuerpo para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 caracterizado porque el anticuerpo está mutado a nivel de su región Fc por la adición de azúcares, modulando así la activación de las células inmunitarias y de las moléculas del sistema del complemento.

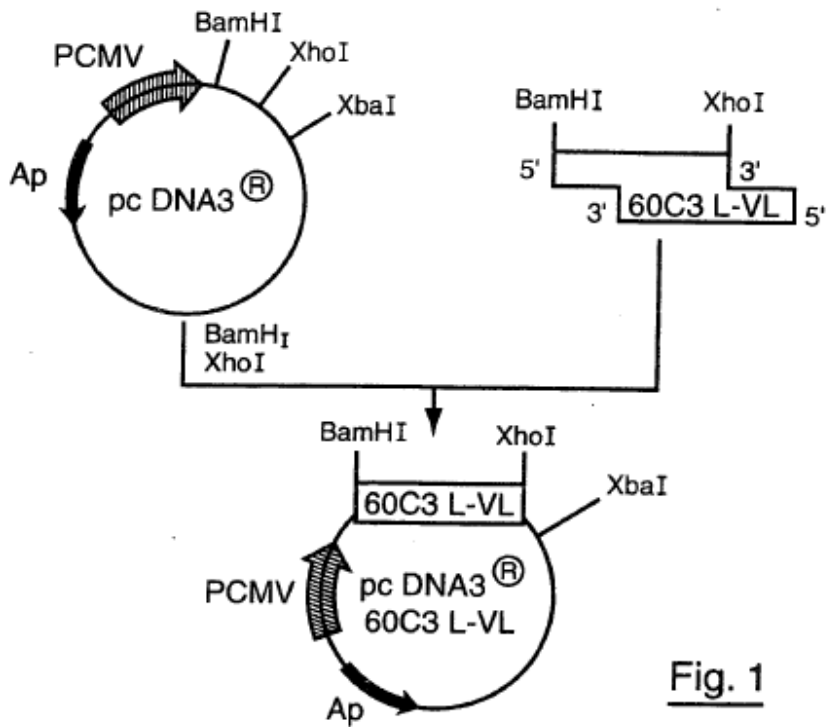


Fig. 1

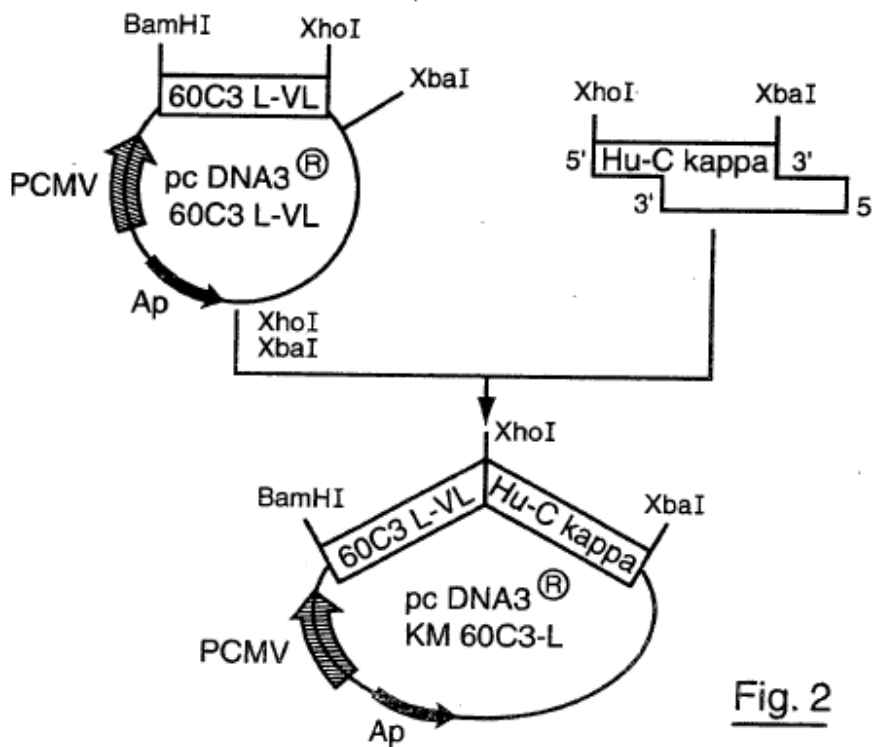


Fig. 2

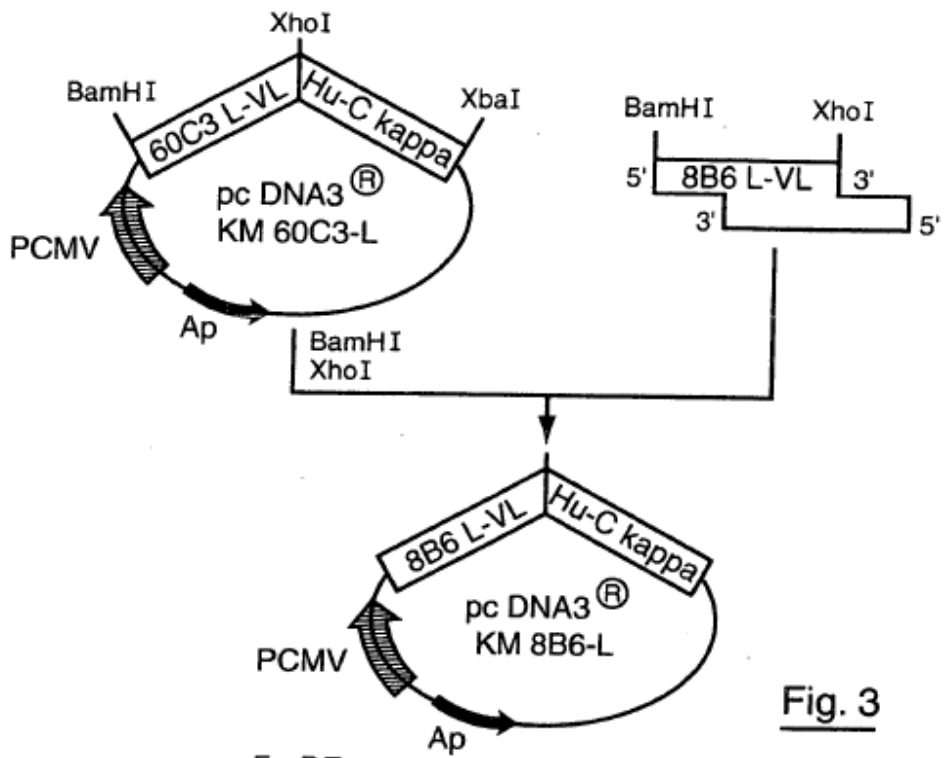


Fig. 3

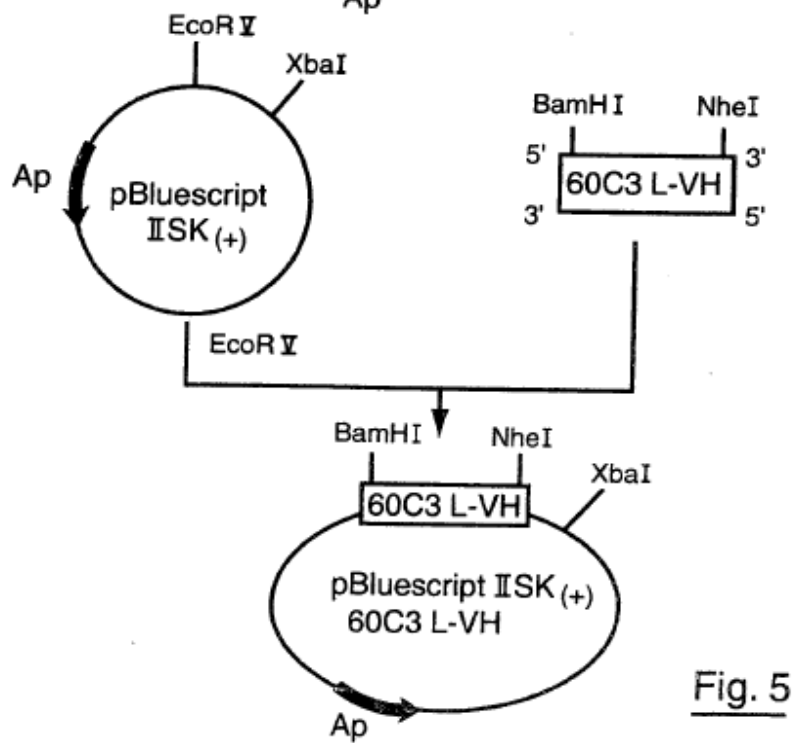


Fig. 5

```

BamH I
|
- 19          -11
GGA TCC GCC ACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTG ATG TTC TGG ATT CCT GGT TCC AGC
      M  K  L  P  V  R  L  L  V  L  M  P  W  I  P  G  S  S
      |→ Péptido señal

1          11          21
AGT GAT GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA GAT CAA GCC TCA ATC
S  D  V  V  M  T  Q  T  P  L  S  L  P  V  S  L  G  D  Q  A  S  I
      |→ FR1

          31          41
TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC CTT CTA AAA AAT AAT GGA AAC ACC TTT TTA CAT TGG TAC CTG CAG
S  C  R  S  S  Q  S  L  L  K  N  N  G  N  T  F  L  H  W  Y  L  Q
      |→ CDR1          |→ FR2

          51          61
AAG TCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTT ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA CTT TCT GGG GTC CCA GAC
K  S  G  Q  S  P  K  L  L  I  Y  K  V  S  N  R  L  S  G  V  P  D
      |→ CDR2          |→ FR2

          71          81
AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA TAT TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT
R  F  S  G  S  G  S  G  T  Y  F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D

          91          101          Xho I
CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT ATT CCG TAC ACA TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTC
L  G  V  Y  F  C  S  Q  S  T  H  I  P  Y  T  F  G  G  G  T  K  L
      |→ CDR 3          |→ FR4

111          121          131
GAG CTG AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA
E  L  K  R  T  V  A  A  P  S  V  F  I  P  P  P  S  D  E  Q  L  K
      |→ C kappa humana

          141          151
TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG
S  G  T  A  S  V  V  C  L  L  N  N  P  Y  P  R  E  A  K  V  Q  W

          161          171
AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC
K  V  D  N  A  L  Q  S  G  N  S  Q  E  S  V  T  E  Q  D  S  K  D

          181          191
AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC
S  T  Y  S  L  S  S  T  L  T  L  S  K  A  D  Y  E  K  H  K  V  Y

          201          211          219
GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT
A  C  E  V  T  H  Q  G  L  S  S  P  V  T  K  S  F  M  R  G  E  C

Xba I
|
TAA TCE AGA

```

Fig. 4

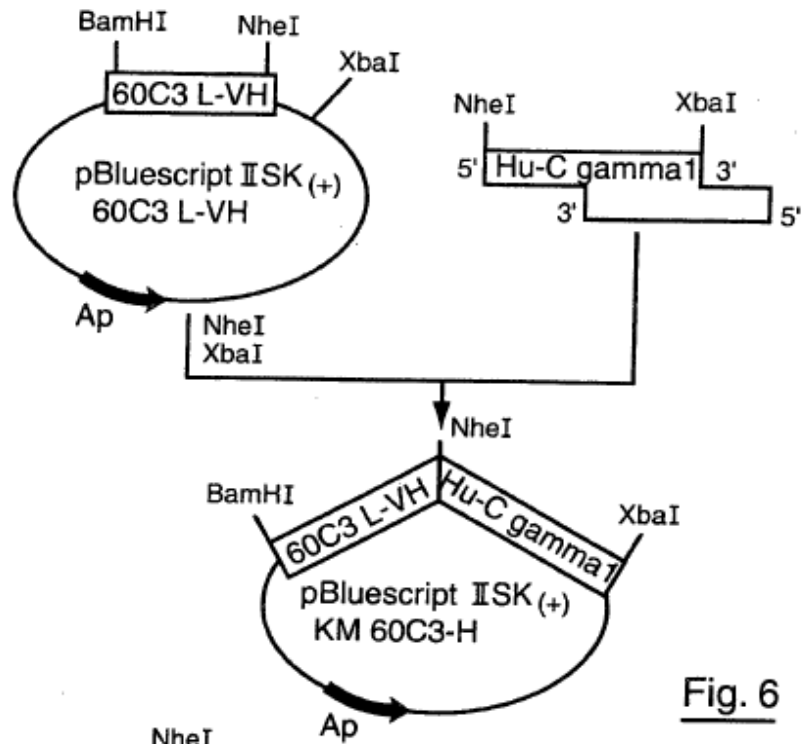


Fig. 6

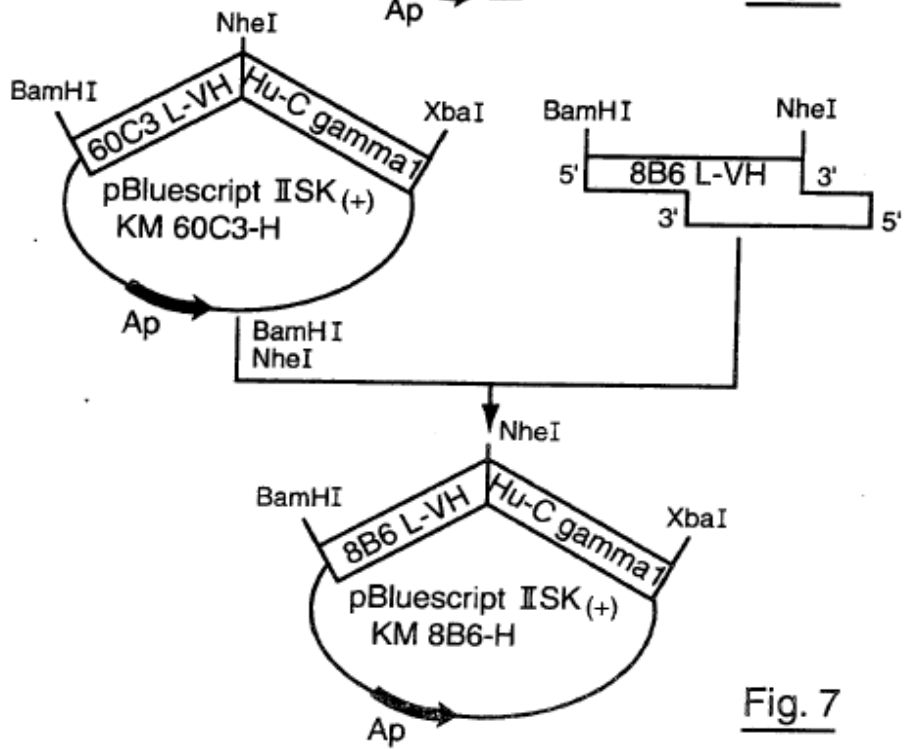


Fig. 7

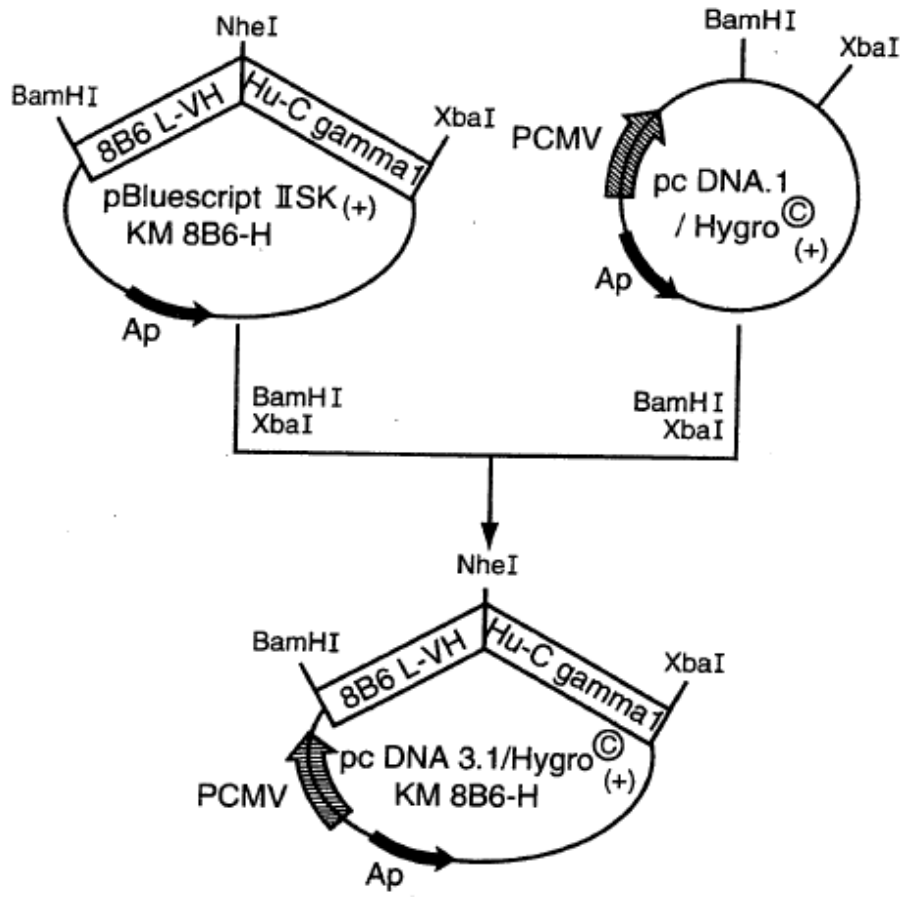


Fig. 8

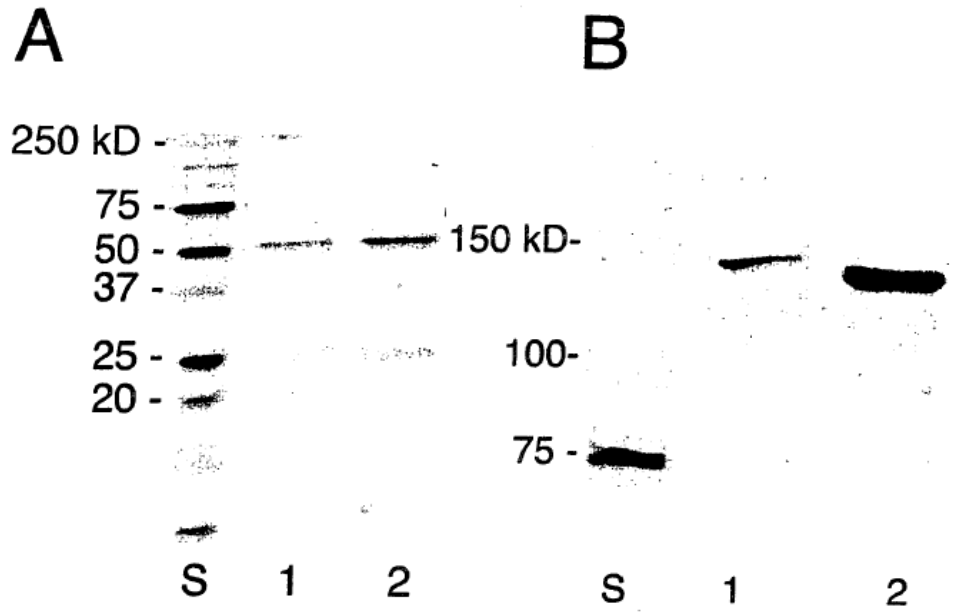


Fig. 10

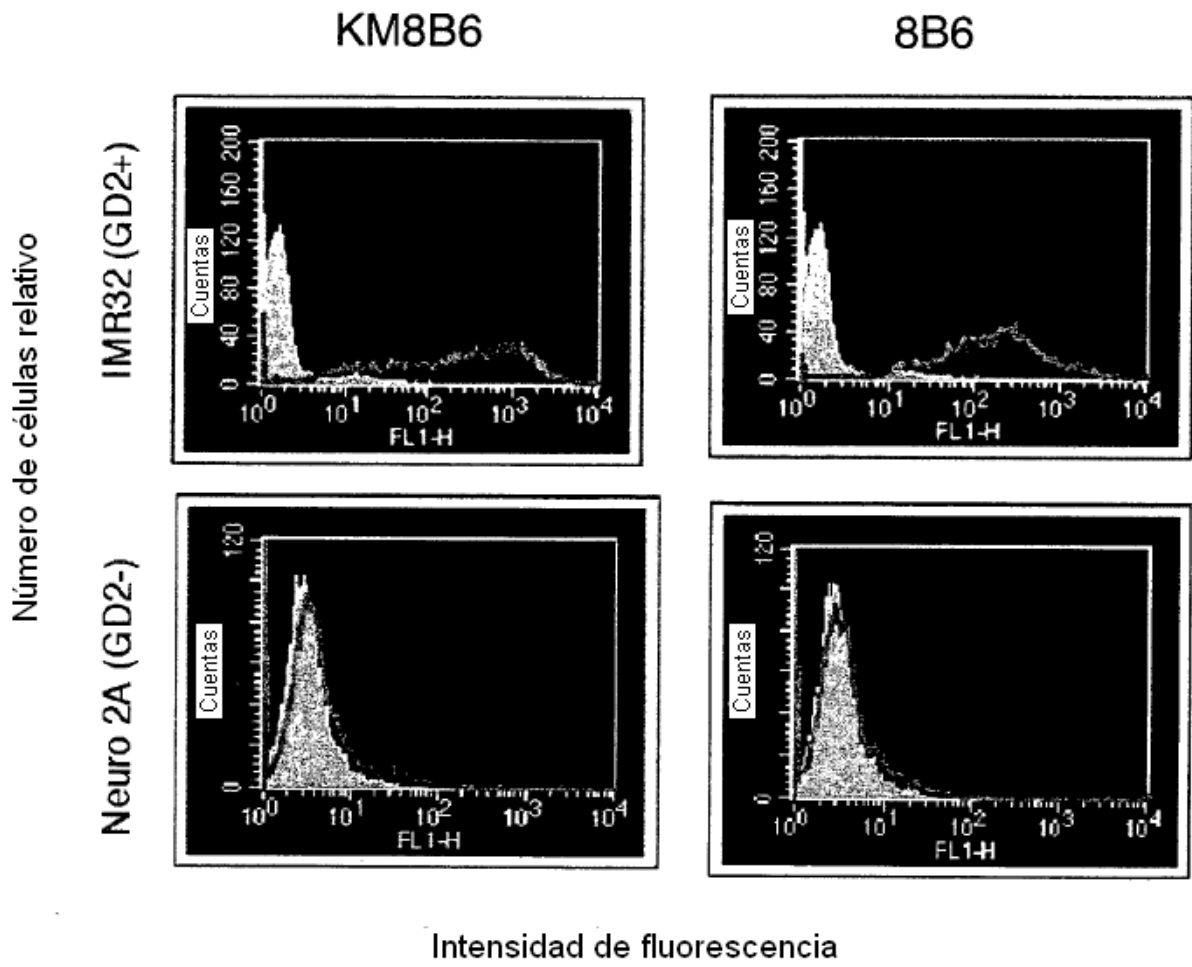


Fig. 11

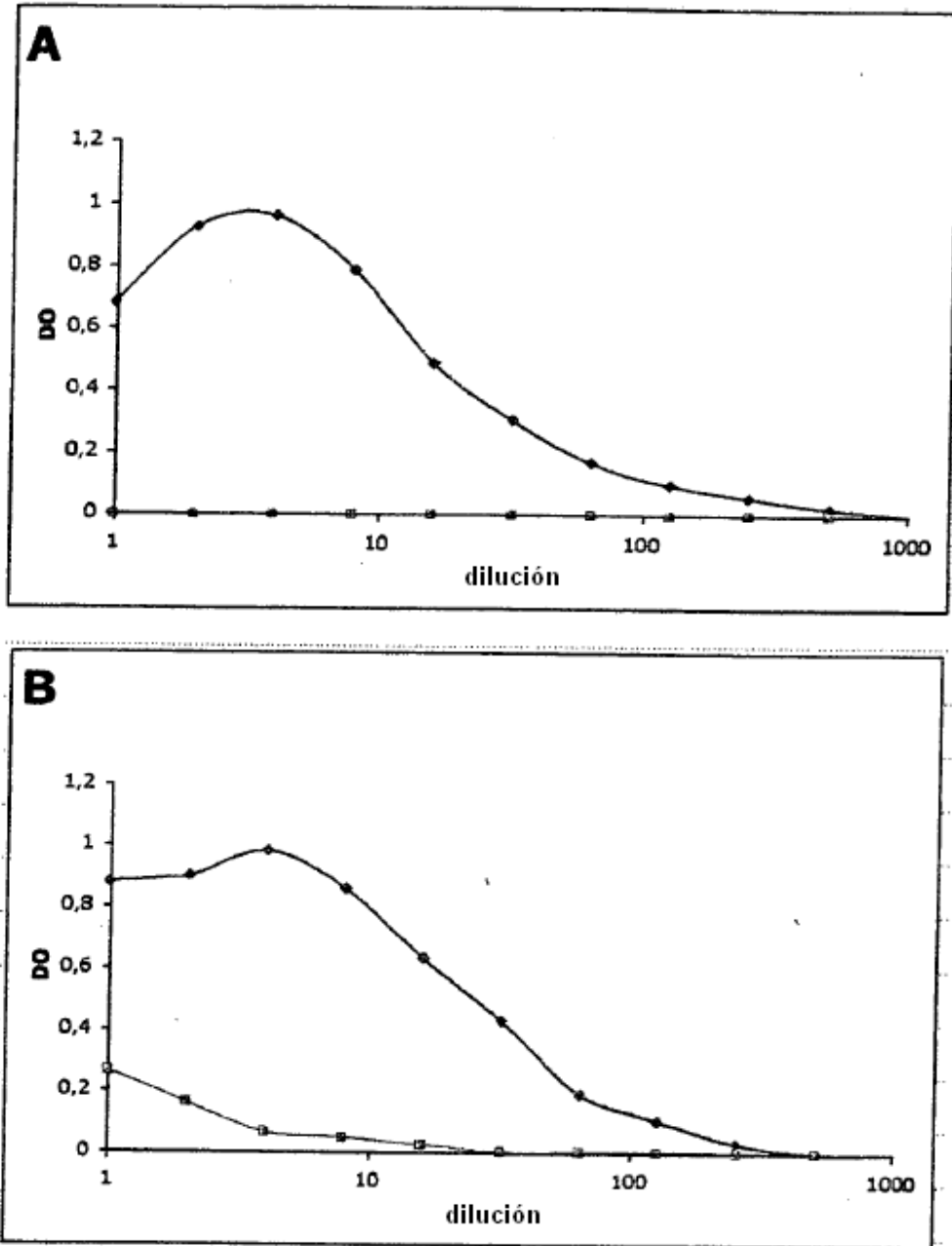


Fig. 12

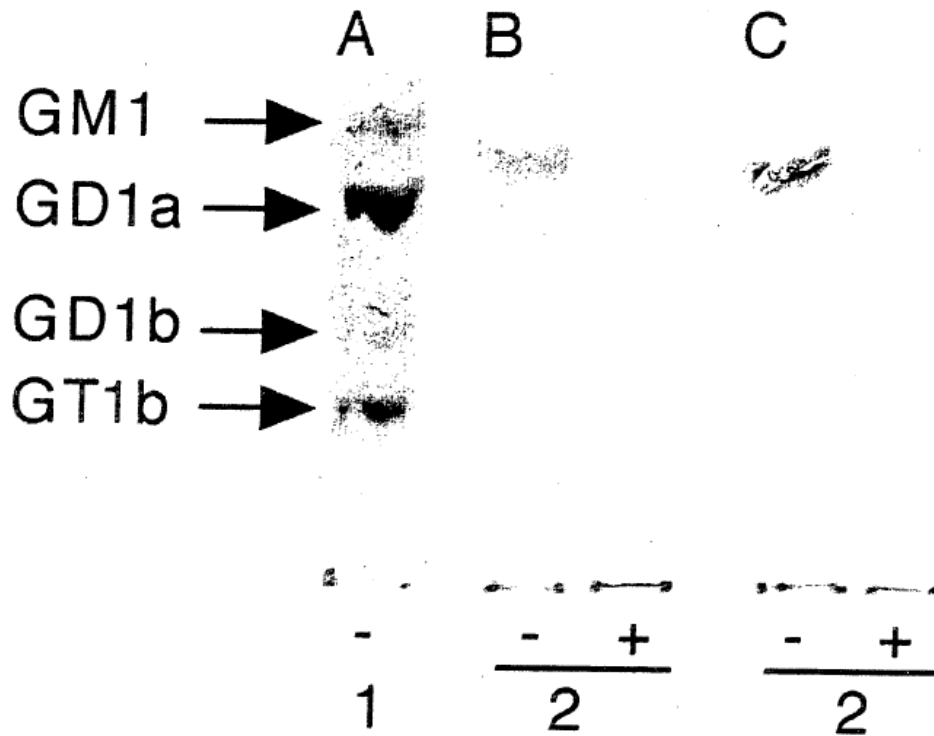


Fig. 13

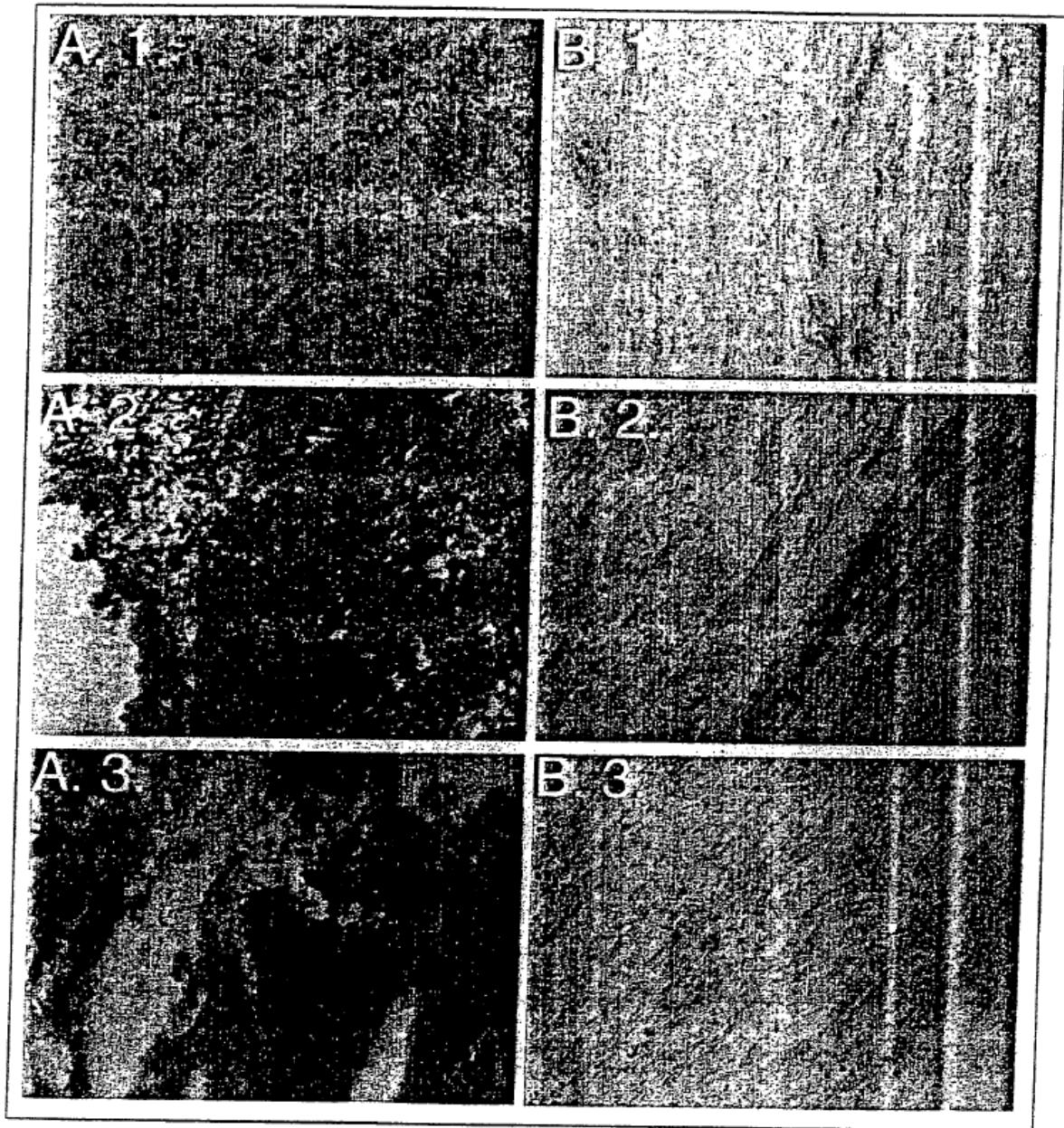
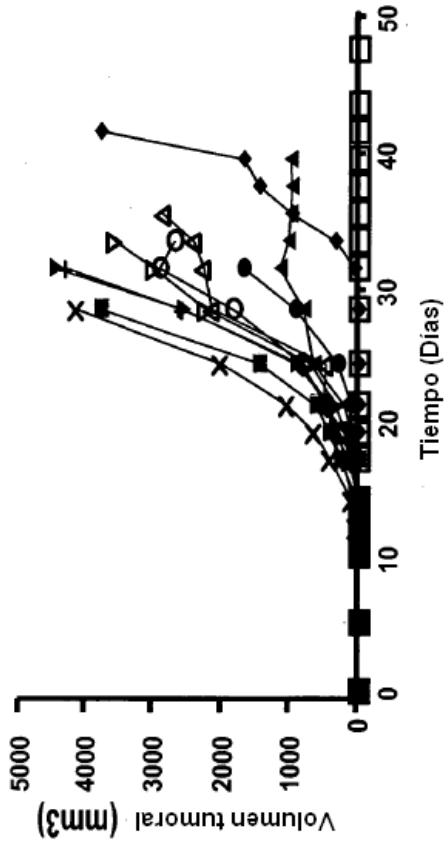


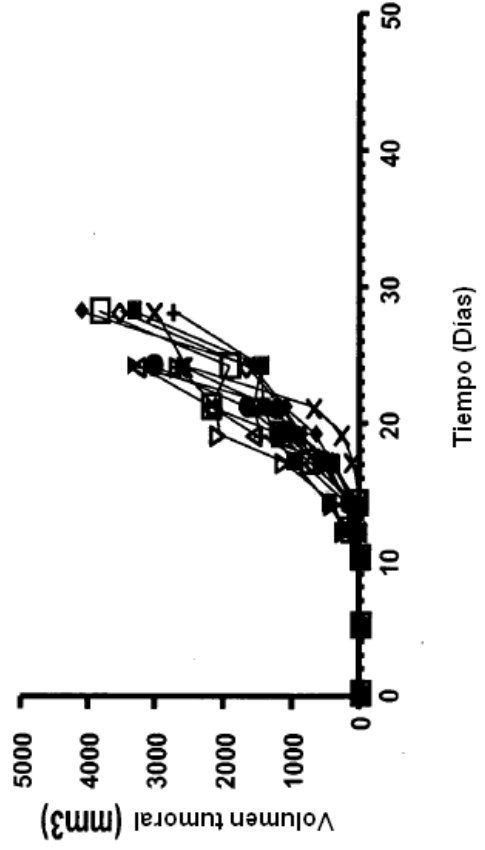
Fig. 14

Anticuerpo	Concentración			
	0 µg/mL	0,1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL
8B6	0 %	10 %	20 %	30 %
KM8B6	0 %	16 %	23 %	44 %
AcM no específico*	0 %	0 %	0 %	0 %

Fig. 15



A



B

Fig.16