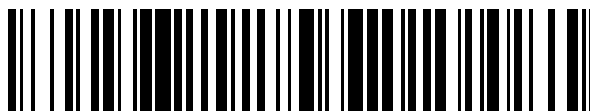


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 979**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2007 E 07797899 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 2027142**

54 Título: **Reactivos de diagnóstico y métodos para su uso**

30 Prioridad:

31.05.2006 US 810185 P

04.08.2006 US 835569 P

16.04.2007 US 923644 P

30.05.2007 US 755699

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

09.07.2013

73 Titular/es:

**LPATH, INC. (100.0%)
4025 Sorrento Valley Blvd.
San Diego, CA 92121 , US**

72 Inventor/es:

**SABBADINI, ROGER, A.;
GARLAND, WILLIAM, A. y
HANSEN, GENEVIEVE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 411 979 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

Reactivos de diagnóstico y métodos para su uso

La presente invención describe anticuerpos monoclonales y métodos para generar anticuerpos contra inmunógenos que comprenden una molécula lipídica bioactiva que desempeña un papel en enfermedades humanas y/o animales como molécula de señalización. Una clase concreta de lípidos bioactivos de señalización a la que se puede aplicar la invención son los lisolípidos. Los lisolípidos de señalización particularmente preferidos son la esfingosina-1-fosfato (S1P) y los diversos ácidos lisofosfatídicos (LPA). Los anticuerpos descritos en la presente pueden modificarse aún más para que sean adecuados para su uso en especies animales concretas, que incluyen al ser humano, sin provocar una respuesta inmunológica neutralizante. Estos anticuerpos y sus derivados y variantes, pueden utilizarse para el tratamiento y/o la prevención de diversas enfermedades o trastornos por medio de la administración de composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos y/o tratamientos. Además, los anticuerpos también pueden utilizarse para detectar lípidos de señalización bioactivos en muestras biológicas, proporcionando con ello información útil para muchos fines que incluyen, pero no se limitan al diagnóstico y/o la prognosis de enfermedades y el descubrimiento y el desarrollo de nuevas modalidades de tratamientos que modifiquen la producción y/o las acciones del lípido diana concreto. Las enfermedades o los trastornos que se verán afectados por las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a enfermedades que presentan hiperproliferación, angiogénesis, inflamación, fibrosis y/o apoptosis como parte de su patología subyacente.

Antecedentes de la invención

1. Antecedentes

A. Lípidos de señalización bioactivos

Los lípidos y sus derivados se reconocen ahora como importantes dianas para la investigación médica, no sólo como simples elementos estructurales en las membranas celulares, agentes solubilizantes, materia prima para vitaminas u hormonas, o como fuente de energía para la β -oxidación, la glicólisis u otros procesos metabólicos. En concreto, ciertos lípidos bioactivos actúan como mediadores de la señalización importantes en enfermedades de animales y seres humanos. Aunque la mayoría de los lípidos en la membrana plasmática desempeñan un papel exclusivamente estructural, una pequeña proporción está implicada en transmitir estímulos extracelulares hacia el interior de las células. La "señalización de lípidos" se refiere a cualquiera de una serie de vías de transducción de señales celulares que emplean lípidos bioactivos como primer o segundo mensajero, incluyendo la interacción directa de una molécula de señalización lipídica con su propio receptor específico. Las vías de señalización lipídicas son activadas por una diversidad de estímulos extracelulares, que varían desde factores del crecimiento a citoquinas inflamatorias y regulan las decisiones del destino de la célula, tales como la apoptosis, la diferenciación y la proliferación. La investigación de la señalización de lípidos bioactivos es un área de intensa investigación científica a medida que se van identificando cada vez más lípidos bioactivos y se caracterizan sus acciones.

Los ejemplos de lípidos bioactivos incluyen los eicosanoides derivados del ácido araquidónico (que incluyen los metabolitos de eicosanoides, tales como los HETE, cannabinoides, leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienoicos, e isoeicosanoides), mediadores de cannabinoides no eicosanoides, fosfolípidos y sus derivados, tales como ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipinas, así como lisofosfolípidos, tales como lisofosfatidilcolina (LPC) y diversos ácidos lisofosfatídicos (LPA). Los mediadores lipídicos de señalización bioactivos también incluyen los esfingolípidos, tales como ceramida, ceramida-1-fosfato, esfingosina, esfinganina, esfingosilfosforilcolina (SPC) y esfingosina-1-fosfato (S1P). Los esfingolípidos y sus derivados representan un grupo de moléculas de señalización extracelular e intracelular con efectos pleiotrópicos sobre importantes procesos celulares. Otros ejemplos de lípidos de señalización bioactivos incluyen fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PEA), diacilglicérido (DG), sulfatidas, gangliósidos y cerebrósidos.

Tal como se esperaría, los lípidos biológicos (es decir, los lípidos que aparecen en la naturaleza, en particular en organismos vivos) generalmente son no inmunogénicos o son muy débilmente inmunogénicos. Como tales, los lípidos se han considerado tradicionalmente como dianas inapropiadas para las estrategias terapéuticas y de diagnóstico/prognosis basadas en anticuerpos. La bibliografía contiene un informe acerca de un anticuerpo monoclonal que se dirige a una forma derivatizada de fosfatidilserina (PS), conjugado con una proteína portadora. La fosfatidilserina es un aminofosfolípido de la membrana plasmática. La pérdida de la orientación hacia el interior o el exterior del lípido de membrana, en particular la emergencia de la fosfatidilserina a la superficie celular, da como resultado la expresión de propiedades alteradas de la superficie que modulan la función celular e influyen en la interacción de las células con su entorno (Zwaal y Schroit (1997), Blood, 89:1121-1132). Por ejemplo, la PS se redistribuye desde la cara interna de la membrana celular (su emplazamiento normal) hacia la cara externa durante la apoptosis.

Díaz, Balasubramanian y Schoirt (Bioconj. Chem. (1998), 9:250-254) describen la producción de antígenos lipídicos que provocan respuestas inmunológicas específicas contra la PS. El acoplamiento covalente de la PS a un portador proteico (BSA) a través de la cadena lateral de acilo graso del lípido conserva intacto el grupo de cabeza de la PS

como epitopo. Schroit (patente de EEUU 6.300.308, patente de EEUU 6.806.354) describe anticuerpos que se unen de modo específico a la fosfatidilserina (PS) o a un conjugado de fosfatidilcolina (PC)/polipéptido o de PS/polipéptido, que se forman administrando un conjugado de PS/polipéptido o un conjugado de PC/polipéptido a un animal. También se describen métodos para detectar PS, un conjugado de PC/polipéptido o de PS/polipéptido.

5 También se describen métodos para fabricar un anticuerpo que se une de modo específico a PS mediante la administración a un animal de una composición farmacéutica que comprende una composición de conjugado de PS/polipéptido, así como métodos para tratar el cáncer en el animal al cual se administra el conjugado, es decir, como una vacuna del cáncer. También se describe la inducción de autoinmunidad para la terapia del cáncer mediante la inmunización de animales con complejos de β 2-glicoproteína/lípido (es decir, lípido y glicoproteína con asociación no covalente). Los autores afirman que se dirigen varias respuestas autoinmunológicas contra los complejos de β 2-glicoproteína/lípido (citando a Schousboe (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 579:396-408) y así la generación de una respuesta anti-complejo puede representar un avance muy importante en el tratamiento de cánceres.

15 Thorpe, Schroit *et al.* describen un anticuerpo monoclonal (3G4) que se une a fosfolípidos aniónicos en presencia de suero o de la proteína sérica β 2-glicoproteína I (β 2-GPI) (Luster *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281:29863-29871). Descrito en un primer momento como un anticuerpo que se dirige específicamente a fosfolípidos aniónicos, este anticuerpo se dirige a células endoteliales en tumores de ratones (Ran *et al.* (2005), *Clin. Cancer Res.*, 11:1551-1562). Posteriormente se demostró que el anticuerpo se une a complejos de fosfolípidos aniónicos y β 2-GPI sobre vasos de tumores, de modo que la unión del anticuerpo a PS depende de β 2-GPI (Huang *et al.* (2005), *Cancer Res.*, 65:4408-4416). El anticuerpo potencia la unión de β 2-GPI a las células endoteliales a través de la dimerización de β 2-GPI. De hecho, los dímeros de β 2-GPI artificiales pueden unirse a las membranas de las células endoteliales incluso en ausencia del anticuerpo (Luster *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281:29863-29871). Una versión humanizada de 3G4 (tarvacina, baviximab) se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer y de enfermedades víricas.

25 Thorpe *et al.* (documento WO 2004/006847) describe anticuerpos, sus fragmentos o inmunoconjugados que se unen a PS y compiten con el anticuerpo 3G4 por la unión a la PS. Thorpe *et al.* (documentos US 6.818.213, US 6.312.294 y US 6.783.760) describen conjugados terapéuticos que se unen a aminofosfolípidos y tienen un agente terapéutico unido.

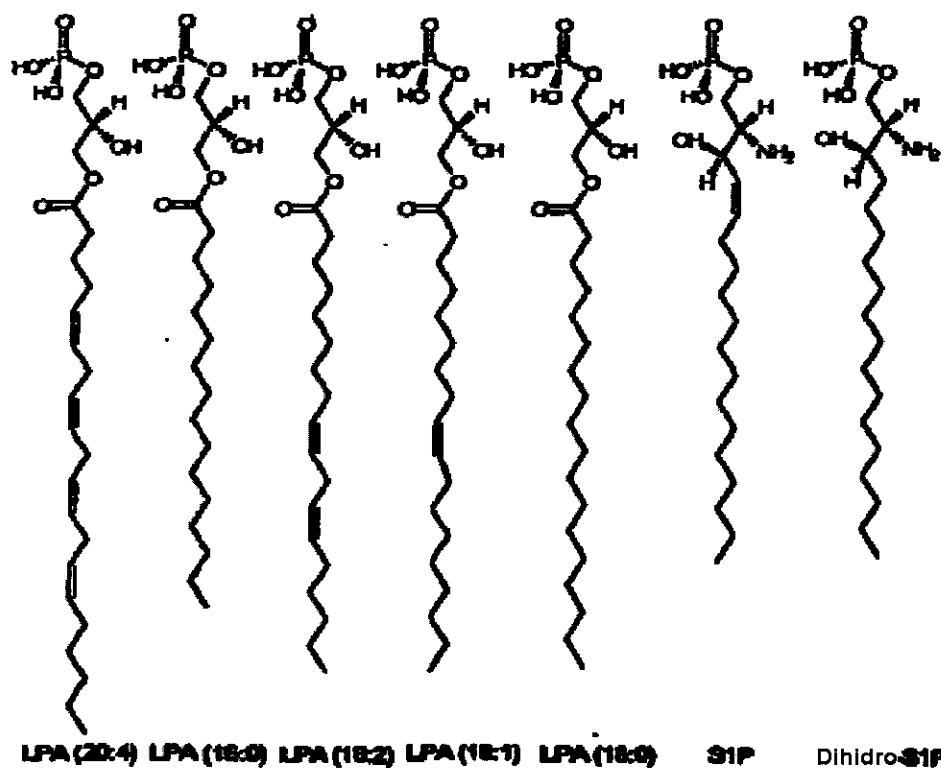
30 Baldo *et al.* (patente de EEUU 5.061.626) describen anticuerpos contra el factor activador de plaquetas (PAF), análogos de PAF empleados para generar anticuerpos e inmunoensayos que emplean PAF o análogos de PAF. El PAF es un plasmalógeno de colina en el que la posición C-2 (sn2) del glicerol está esterificada con un grupo acetilo en lugar de un ácido graso de cadena larga.

35 Vielhaber *et al.* indican la caracterización de dos reactivos de anticuerpos supuestamente específicos para ceramidas, uno es un suero de ratón policlonal enriquecido en IgM y el otro es un anticuerpo monoclonal IgM. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal era específico para la esfingomielina y que el antisuero reaccionaba con diversas especies de ceramidas en el intervalo nanomolar (Vielhaber G. *et al.* (2001), *Glycobiology*, 11:451-457). También citan la falta de reactivos de anticuerpos contra ceramidas disponibles en el mercado. Krishnamurthy *et al.* indicaron recientemente la generación de IgG de conejo contra ceramidas (*J. Lipid Res.* (2007), 48:968-975).

B. Lisolípidos

40 Los lisolípidos son lípidos de bajo peso molecular que contienen un grupo de cabeza polar y un único esqueleto hidrocarbonado, debido a la ausencia de un grupo acilo en una o ambas posiciones posibles de acilación. Con relación al grupo de cabeza polar en sn-3, la cadena hidrocarbonada puede estar en la posición sn-2 y/o sn-1 (el término "liso", que originariamente se refería a la hemólisis, ha sido redefinido por la IUPAC para indicar la desacilación). Véase "Nomenclature of Lipids", www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/lipin2.html. Estos lípidos son representativos de los lípidos de señalización bioactivos y su importancia biológica y médica destaca lo que puede lograrse mediante el transporte dirigido de moléculas de señalización lipídicas para fines terapéuticos, de diagnóstico/prognosis o de investigación (Gardell *et al.* (2006), *Trends in Molecular Medicine*, vol. 12:65-75). Dos ejemplos concretos de lisolípidos importantes desde el punto de vista médico son LPA (esqueleto de glicerol) y S1P (esqueleto de esfingolípido). Otros lisolípidos incluyen esfingosina, lisofosfatidilcolina (LPC), esfingofosforilcolina (lisoesfingomielina), ceramida, ceramida-1-fosfato, esfinganina (dihidroesfingosina), dihidroesfingosina-1-fosfato y N-acetilceramida-1-fosfato. Por contraste, los plasmalógenos, que contienen un O-alquil (-O-CH₂-) u O-alquenil éter en el C-1 (sn1) y un acilo en C-2, están excluidos del género de lisolípidos.

A continuación se presentan estructuras seleccionadas de LPA, S1P y dihidro-S1P.



5 El LPA y la El LPA no es una única entidad molecular sino una colección de variantes estructurales endógenas con ácidos grasos de diversas longitudes y grados de saturación (Fijiwara *et al.* (2005), *J. Biol. Chem.*, vol. 280:35038-35050). El esqueleto estructural de los LPA se deriva de fosfolípidos con una base de glicerol, tales como fosfatidilcolina (PC) o ácido fosfatídico (PA). En el caso de los lisoesfingolipidos, tales como S1P, el ácido graso del esqueleto de ceramida en sn-2 está ausente. El esqueleto estructural de S1P, dihidro-S1P (DHS1P) y esfingosilfosforilcolina (SPC) está basado en la esfingosina, que se deriva de la esfingomielina.

10 LPA y S1P regulan diversas vías de señalización celular mediante su unión a la misma clase de receptores acoplados a proteína G (GPCR) de múltiples dominios transmembrana (Chun J., Rosen H. (2006), *Current Pharm. Des.*, vol. 12:161-171; y Moolenaar, W.H. (1999), *Experimental Cell Research*, vol. 253:230-238). Los receptores de S1P se denominan S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ y S1P₅ (anteriormente EDG-1, EDG-5/AGR16, EDG-3, EDG-6 y EDG-8) y los receptores de LPA se denominan LPA₁, LPA₂ y LPA₃ (anteriormente EDG-2, EDG-4 y EDG-7). Se ha identificado un cuarto receptor de LPA de esta familia para LPA (LPA₄) y también se han indicado otros receptores putativos para estos lisofosfolípidos.

15 C. Ácidos lisofosfáticos (LPA)

Los LPA se conocen desde hace tiempo como precursores de la biosíntesis en células eucariotas y procariotas, pero sólo ha sido en fechas recientes que los LPA han surgido como moléculas de señalización que son producidas y liberadas con rapidez por las células activadas, en particular plaquetas, para influir en las células diana actuando sobre un receptor de la superficie celular específico (véase, por ejemplo, Moolenaar *et al.* (2004), *BioEssays*, vol. 26:870-881; y van Leewan *et al.* (2003), *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 31:1209-1212). Además de ser sintetizado y procesado para producir fosfolípidos más complejos en el retículo endoplásmico, el LPA puede generarse a través de la hidrólisis de fosfolípidos preexistentes después de la activación celular; por ejemplo, en la posición sn-2 habitualmente falta un resto ácido graso debido a la desacilación, dejando sólo el hidroxilo sn-1 esterificado en un ácido graso. Además, una enzima clave para la producción de LPA, la autotoxina (lisoPLD/NPP2), puede ser el producto de un oncogén, puesto que muchos tipos de tumores sobreexpresan la autotoxina (Brindley, D. (2004), *J. Cell Biochem.*, vol. 92:900-12). Se han indicado concentraciones de LPA en el plasma y el suero humanos, incluyendo determinaciones realizadas utilizando un procedimiento de LC/MS sensible y específico (Baker *et al.* (2001), *Anal. Biochem.*, vol. 292:287-295). Por ejemplo, en suero humano recién preparado dejado en reposo a 25 °C durante una hora, se ha calculado que las concentraciones de LPA serán de aproximadamente 1,2 mM, siendo las especies predominantes los análogos de LPA 16:0, 18:1, 18:2 y 20:4. De modo similar, en plasma humano recién preparado dejado en reposo a 25 °C durante 1 hora, se ha calculado que las concentraciones de LPA serán de aproximadamente 0,7 mM, siendo las especies predominantes LPA 18:1 y 18:2.

El LPA influye en una amplia gama de respuestas biológicas, que varían de la inducción de la proliferación celular, la estimulación de la migración celular y la retracción de neuritas, el cierre de huecos entre uniones, e incluso la quimiotaxis de mohos del limo (Goetzl *et al.* (2002), *Scientific World Journal*, vol. 2:324-338). El conjunto del conocimiento acerca de la biología del LPA sigue creciendo a medida que se van ensayando cada vez más sistemas celulares para la respuesta a LPA. Por ejemplo, ahora se sabe que, además de estimular el crecimiento y la proliferación celular, el LPA estimula la tensión celular y la unión de fibronectina a la superficie celular, que son acontecimientos importantes en la regeneración y la reparación de heridas (Moolenaar *et al.* (2004), *BioEssays*, vol. 26:870-881). En fechas recientes, también se ha atribuido una actividad antiapoptótica a LPA y recientemente se ha indicado que el receptor gamma de proliferación de peroxisomas es un receptor/diana para LPA (Simon *et al.* (2005), *J. Biol. Chem.*, vol. 280:14656-14662).

El LPA ha demostrado ser una diana difícil para la producción de anticuerpos, aunque existe un informe en la bibliografía científica acerca de la producción de anticuerpos policlonales murinos contra LPA (Chen *et al.* (2000), *Med. Chem. Lett.*, vol. 10:1691-3).

D. Esfingosina-1-fosfato

La S1P es un mediador de la proliferación celular y protege frente a la apoptosis mediante la activación de vías de supervivencia (Maceyka *et al.* (2002), *BBA*, vol. 1585:192-201; y Spiegel *et al.* (2003), *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 4:397-407). Se ha propuesto que un equilibrio entre los niveles de CER/SPH y S1P proporciona un mecanismo reostático que decide si una célula debe dirigirse hacia la vía de la muerte o si debe protegerse frente a la apoptosis. La enzima reguladora clave del mecanismo reostático es la esfingosina quinasa (SPHK), cuyo papel consiste en convertir los lípidos de señalización bioactivos que estimulan la muerte (CER/SPH) en S1P, que estimula el crecimiento. La S1P tiene dos destinos: la S1P puede ser degradada por S1P liasa, una enzima que rompe la S1P en fosfoetanolamina y hexadecanal o, de modo menos habitual, es hidrolizada por la S1P fosfatasa para producir SPH.

La S1P se genera en abundancia y se almacena en las plaquetas, que contienen altos niveles de SPHK y carecen de las enzimas para la degradación de S1P. Cuando las plaquetas se activan se segrega S1P. Además también se cree que otros tipos celulares, por ejemplo, células cebadas, son capaces de segregar S1P. Tras haber sido segregada, se cree que S1P se une en altas concentraciones a proteínas portadoras, tales como lipoproteínas y albúmina del suero. La S1P se encuentra en altas concentraciones en el plasma, habiéndose indicado unas concentraciones en el intervalo de 0,5-5 μM . También se han sugerido acciones intracelulares de la S1P (véase, por ejemplo, Spiegel S., Kolesnick R. (2002), *Leukemia*, vol. 16:1596-602; Suomalainen *et al.* (2005), *Am. J. Pathol.*, vol. 166:773-81).

La expresión ampliamente extendida de receptores de S1P de la superficie celular permite a la S1P influir en un diverso espectro de respuestas celulares, que incluyen la proliferación, la adhesión, la contracción, la movilidad, la morfogénesis, la diferenciación y la supervivencia. Este espectro de respuestas parece depender de patrones de expresión solapados o diferenciados de los receptores de S1P dentro de los sistemas celulares y tisulares. Además, recientemente se ha demostrado una comunicación cruzada entre S1P y las vías de señalización de factores del crecimiento, que incluyen el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor del crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (véase, por ejemplo, Baudhuin *et al.* (2004), *FASEB J.*, vol. 18:341-3). La regulación de diversos procesos celulares que implican a S1P tiene un impacto concreto sobre la señalización neuronal, el tono vascular, la curación de heridas, el tráfico de células inmunológicas, la reproducción y la función cardiovascular, entre otros. Las alteraciones de los niveles endógenos de S1P dentro de estos sistemas puede tener efectos perjudiciales, provocando varios trastornos patofisiológicos, que incluyen cáncer, insuficiencia cardíaca y enfermedades infecciosas y autoinmunitarias.

Una nueva estrategia reciente para tratar el cáncer inventada por el doctor Sabbadini implica reducir los niveles extracelulares biológicamente disponibles de S1P, como estrategia individual o combinada con tratamientos anticáncer convencionales, que incluyen la administración de agentes quimioterapéuticos, tales como una antraciclina. Para este fin, se ha descrito la generación de anticuerpos específicos para S1P. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EEUU de propiedad de los solicitantes nº de serie 10/820.582. Estos anticuerpos, que pueden adsorber a la S1P del suero de modo selectivo, actúan como esponjas moleculares para neutralizar la S1P extracelular. Véanse también las patentes de EEUU de propiedad de los solicitantes nº 6.881.546 y 6.858.383 y las solicitudes de patente de EEUU nº de serie 10/028.520, 10/029.372 y 11/101.976. Puesto que se ha demostrado que S1P también es proangiogénica, un beneficio añadido a la eficacia del anticuerpo es su capacidad para privar de nutrientes y oxígeno a los tumores en crecimiento limitando el suministro de sangre.

Lo que resulta particularmente exclusivo acerca de la estrategia anti-S1P es que aunque se han propuesto estrategias anticáncer basadas en esfingolípidos que se dirigen a enzimas clave de la vía metabólica de esfingolípidos, tales como SPHK, el propio mediador lipídico S1P no ha sido previamente enfatizado, en gran medida por las dificultades para mitigar directamente esta diana lipídica, en particular debido a la dificultad que surge en primer lugar para generar anticuerpos contra un lípido diana, tal como S1P y en segundo lugar, para detectar anticuerpos que de hecho se han producido contra la diana de S1P. Como ya se ha mencionado, existen dificultades similares con respecto a los tratamientos y a las estrategias de diagnóstico dirigidos a otras dianas lipídicas. Esta

invención proporciona una solución eficaz para ambos dilemas.

5 El documento EP 0736770 A describe conjugados inmunorreactivos que comprenden un hapteno acoplado con una proteína portadora y/o un soporte sólido mediante un agente de acoplamiento reactivo con SH, en los que los haptenos se seleccionan de aminoácidos, carbohidratos, carbohidratos aminados, fosfatidilinositol, esfingosina y sus derivados nitrosilados y/o acetilados y la proteína portadora es hidrosoluble y tiene un peso molecular >8000 kDa. También se describen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos dirigidos contra los conjugados mencionados anteriormente; anticuerpos y fragmentos de anticuerpos dirigidos contra los anticuerpos y los fragmentos mencionados anteriormente; y un aparato de diagnóstico que contiene los anticuerpos o sus fragmentos mencionados anteriormente.

10 El documento WO 03/000701 describe fosfolípidos funcionalizados con tiol que están unidos covalentemente a un sustrato de oro y/o plata, métodos para prepararlos, e intermedios útiles para estos fines.

2. Definiciones

15 Antes de describir la presente invención con detalle se definirán varios términos y expresiones utilizados en el contexto de la presente invención. Además de estos términos y expresiones, se definen otros a lo largo de esta memoria descriptiva cuando sea necesario. A menos que se indique expresamente lo contrario en la presente, los términos y las expresiones de la técnica utilizados en esta memoria descriptiva tendrán los significados reconocidos en la técnica.

Un "anticuerpo anti-S1P" se refiere a cualquier anticuerpo o molécula derivada de un anticuerpo que se une a S1P.

20 Un "lípidio bioactivo" se refiere a una molécula de señalización lipídica. Los lípidos bioactivos se distinguen de los lípidos estructurales (por ejemplo, fosfolípidos unidos a membranas) porque mediante la señalización extracelular y/o intracelular y, así, están implicados en el control de la función de muchos tipos de células modulando la diferenciación, la migración, la proliferación, la secreción, la supervivencia y otros procesos. *In vivo*, los lípidos bioactivos pueden encontrarse en fluidos extracelulares, en donde pueden estar complejados con otras moléculas, por ejemplo proteínas séricas, tales como albúmina y lipoproteínas, o en forma "libre", es decir, no complejados con otra especie molecular. Como mediadores extracelulares, algunos lípidos bioactivos alteran la señalización celular activando los canales de iones o GPCR o enzimas o factores unidos a la membrana que, a su vez, activan sistemas de señalización complejos que producen cambios en la función o la supervivencia celular. Como mediadores intracelulares, los lípidos bioactivos pueden ejercer sus acciones interaccionando directamente con componentes intracelulares, tales como enzimas, canales iónicos o elementos estructurales, tales como la actina. Los ejemplos representativos de lípidos bioactivos incluyen LPA y S1P.

30 Los ejemplos de lípidos bioactivos incluyen esfingolípidos, tales como ceramida, ceramida-1-fosfato, esfingosina, esfingarina, esfingosilfosforilcolina (SPC) y esfingosina-1-fosfato (S1P). Los esfingolípidos y sus derivados y metabolitos se caracterizan por un esqueleto esfingoide (derivado de la esfingomielina). Los esfingolípidos y sus derivados y metabolitos representan un grupo de moléculas de señalización extracelular e intracelular con efectos pleiotrópicos sobre importantes procesos celulares. Incluyen sulfatidas, gangliósidos y cerebrósidos. Otros lípidos bioactivos se caracterizan por un esqueleto con una base de glicerol; por ejemplo, lisofosfolípidos, tales como lisofosfatidilcolina (LPC) y diversos ácidos lisofosfatídicos (LPA), así como fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PEA), ácido fosfatídico, factor activador de plaquetas (PAF), cardiolipina, fosfatidilglicerol (PG) y diacilglicérido (DG). Otros lípidos bioactivos se derivan del ácido araquidónico; estos incluyen los eicosanoides (incluyendo los metabolitos de eicosanoides, tales como los HETE, cannabinoides, leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienoicos, e isoicosanoides) y mediadores de cannabinoides no eicosanoides. En la presente descripción también pueden utilizarse otros lípidos bioactivos, incluyendo otros fosfolípidos y sus derivados.

45 En algunas realizaciones descritas en la presente puede resultar preferible utilizar lípidos bioactivos con una base de glicerol (que tienen un esqueleto derivado del glicerol, tales como los LPA) para la producción de anticuerpos, en oposición a los lípidos bioactivos con una base de esfingosina (los que tienen un esqueleto esfingoide, tales como esfingosina y S1P). En otras realizaciones, puede desearse utilizar lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico para la generación de anticuerpos y en otras realizaciones se prefieren lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico y derivados del glicerol, pero no lípidos bioactivos derivados de esfingoides. Juntos, los lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico y derivados del glicerol pueden denominarse en el contexto de esta invención "lípidos bioactivos no esfingoides".

Se excluyen específicamente de la clase de lípidos bioactivos según la invención la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina, así como sus metabolitos y derivados que actúan principalmente como miembros estructurales de la cara interna y/o externa de las membranas celulares.

55 Un "biomarcador" es un compuesto bioquímico específico en el cuerpo que tiene una característica molecular concreta que hace que sea útil para medir el avance de una enfermedad o los efectos de un tratamiento. Por ejemplo, S1P es un biomarcador para ciertos trastornos hiperproliferativos y/o cardiovasculares.

Un "portador" se refiere a un resto adaptado para su conjugación con un hapteno, haciendo con ello que el hapteno

sea inmunogénico. Una clase representativa no limitante de portadores son las proteínas, cuyos ejemplos incluyen albúmina, hemocianina de lapa, hemaglutinina, toxoide tetánico y diftérico. Otras clases y ejemplos de portadores adecuados para su uso según la invención son conocidos en la técnicas. Estos, así como los portadores naturales o sintéticos que se descubran o se inventen posteriormente, pueden adaptarse para su aplicación según la invención.

5 La expresión "agente quimioterapéutico" significa agentes anticáncer y otros agentes antihiperproliferativos. Dicho en términos sencillos, un "agente quimioterapéutico" se refiere a un compuesto químico previsto para destruir células y tejidos. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a agentes que dañan el ADN y agentes que inhiben la síntesis de ADN: antraciclinas (doxorrubicina, donorrubicina, epirubicina), agentes alquilantes (bendamustina, busulfano, carboplatino, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida, dacarbazina, hexametilmelamina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalano, mitotano, mitomicina, pipobromano, procarbazona, estreptozocina, tiotepa y trietilmelamina), derivados del platino (cisplatino, carboplatino, cis-diamina-dicloroplatino), e inhibidores de topoisomerasa (camptosar); antimetabolitos, tales como capecitabina, clorodesoxiadenosina, citarabina (y su forma activada, ara-CMP), citosina arabinósido, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, 5-DFUR, gemcitabina, hidroxiurea, 6-mercaptopurina, metotrexato, pentostatina, trimetrexato, 6-tioguanina); antiangiogénicos (bevacizumab, talidomida, sunitinib, lenalidomida, TNP-470, 2-metoxiestradiol, ranibizumab, sorafenib, erlotinib, bortezomib, pegaptanib, endostatina); agentes disruptores vasculares (flavonoides/flavonas, DMXAA, derivados de combrestatina, tales como CA4DP, ZD6126, AVE8062A, etc.); compuestos biológicos, tales como anticuerpos (herceptina, avastina, panorex, rituxina, zevalina, milotarg, campath, bexxar, erbitux); terapia endocrina: inhibidores de aromatasa (4-hidroandrostendiona, exemestano, aminoglutetimida, anastrozol, letozol), antiestrógenos (tamoxifeno, toremifina, raioxifeno, faslodex), esteroides, tales como dexametasona; compuestos inmunomoduladores: citoquinas, tales como IFN-beta e IL-2, inhibidores de integrinas, otras proteínas de adhesión y metaloproteinasas de matriz; inhibidores de histona desacetilasa, tales como ácido suberoililidihidroxámico; inhibidores de la transducción de señales, tales como inhibidores de tirosina quinasas, tales como imatinib (gleevec); inhibidores de proteínas de choque térmico, tales como 17-N-alilamino-17-desmetoxigeldaromicin; retinoides, tales como ácido holo-trans-retinoico; inhibidores de receptores de factores del crecimiento o los propios factores del crecimiento; compuestos antimitóticos y/o agentes despolimerizantes de tubulina, tales como taxoides (paclitaxel, docetaxel, taxótero, BAY 59-8862), navelbina, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina; compuestos antiinflamatorios, tales como inhibidores de COX y reguladores del ciclo celular, por ejemplo, reguladores de punto de control e inhibidores de telomerasa.

30 La expresión "terapia de combinación" se refiere a un régimen terapéutico que implica el suministro de al menos dos terapias diferenciadas para lograr un efecto terapéutico indicado. Por ejemplo, una terapia de combinación puede implicar la administración de dos o más ingredientes activos químicamente diferenciados, por ejemplo, un agente quimioterapéutico de acción rápida y un anticuerpo anti-lípidos. Como alternativa, una terapia de combinación puede implicar la administración de un anticuerpo anti-lípidos y/o uno o más agentes quimioterapéuticos, sólo o junto con la administración de otro tratamiento, tal como terapia de radiación y/o cirugía. En el contexto de la administración de dos o más ingredientes activos químicamente diferenciados, se entiende que los ingredientes activos pueden administrarse como parte de la misma composición o como composiciones diferentes. Cuando se administran como composiciones separadas, las composiciones que comprenden los diferentes ingredientes activos pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes, mediante la misma vía o mediante vías diferentes, utilizando el mismo régimen de dosificación o diferentes regímenes de dosificación, según lo requiera el contexto concreto y según sea determinado por el médico encargado. De modo similar, cuando una o más especies de anticuerpos anti-lípidos, por ejemplo, un anticuerpo anti-LPA, solo o junto con uno o más agentes quimioterapéuticos, se combinan, por ejemplo, con radiación y/o cirugía, el fármaco o fármacos pueden administrarse antes o después del tratamiento de cirugía o radiación.

45 Un "conjugado de lípido bioactivo derivatizado" se refiere a un lípido bioactivo derivatizado conjugado covalentemente con un portador. El portador puede ser una molécula proteica o puede ser un resto, tal como polietilenglicol, oro coloidal, adyuvantes o esferas de sílica. Un conjugado de lípido bioactivo derivatizado puede utilizarse como inmunógeno para generar una respuesta de anticuerpos según la presente invención y el mismo conjugado de lípido bioactivo u otro diferente puede utilizarse como reactivo de detección para detectar el anticuerpo así producido. En algunas realizaciones, el conjugado de lípido bioactivo derivatizado se une a un soporte sólido cuando se emplea para la detección.

Un "epitopo" o "determinante antigénico" se refiere a la porción de un antígeno que reacciona con la porción de unión al antígeno de un anticuerpo, derivada de un anticuerpo.

55 Un "hapteno" es una sustancia que no es inmunogénica pero que puede reaccionar con un anticuerpo o con la porción de unión al antígeno derivada de un anticuerpo. En otras palabras, los haptenos tienen la propiedad de la antigenicidad pero no de la inmunogenicidad.

60 La expresión "trastorno hiperproliferativo" se refiere a enfermedades y trastornos asociados con la proliferación incontrolada de células que incluyen, pero no se limitan al crecimiento incontrolado de células de órganos y tejidos que dan como resultado cánceres y tumores benignos. Los trastornos hiperproliferativos asociados con células endoteliales pueden producir enfermedades de angiogénesis, tales como angiomas, endometriosis, obesidad, degeneración macular asociada con el envejecimiento y diversas retinopatías, así como la proliferación de células

- 5 endoteliales y células del músculo liso que provocan reestenosis como consecuencia de la colocación de un stent en el tratamiento de la aterosclerosis. Los trastornos hiperproliferativos que implican a fibroblastos (es decir, fibrogénesis) incluyen, pero no se limitan a trastornos de cicatrización excesiva (es decir, fibrosis), tales como degeneración macular relacionada con el envejecimiento, remodelación cardíaca e insuficiencia asociada con infarto de miocardio, curación excesiva de heridas, tal como la que se produce habitualmente como consecuencia de cirugía o lesiones, queloides y tumores fibroides y colocación de stents.
- 10 Un "inmunógeno" es una molécula capaz de inducir una respuesta inmunológica específica, en particular una respuesta de anticuerpos, en un animal al cual se le ha administrado el inmunógeno. En la presente invención, el inmunógeno es un lípido bioactivo derivatizado conjugado con un portador, es decir, un "conjugado de lípido bioactivo derivatizado". El conjugado de lípido bioactivo derivatizado utilizado como inmunógeno puede emplearse como material de captura para la detección del anticuerpo generado en respuesta al inmunógeno. Así, el inmunógeno también puede utilizarse como reactivo de detección. Como alternativa, el conjugado de lípido bioactivo derivatizado utilizado como material de captura puede tener un conector y/o resto portador diferente del presente en el inmunógeno.
- 15 "Inhibir", en particular en el contexto de un fenómeno biológico, significa disminuir, suprimir o retrasar. Por ejemplo, un tratamiento que produce la "inhibición de la tumorigénesis" puede significar que no se forman tumores, o que se forman tumores pero más lentamente, o que se forman en un número menor que en un control sin tratar.
- 20 En el contexto de esta invención, una "composición líquida" se refiere a una composición que, en su forma rellena y terminada, es proporcionada por el fabricante a un usuario final (por ejemplo, un doctor o un enfermero) como un líquido o una disolución, en oposición a un sólido. En la presente, "sólido" se refiere a composiciones que no son líquidos ni disoluciones. Por ejemplo, los sólidos incluyen composiciones secadas preparadas mediante liofilización, precipitación y procedimientos similares.
- 25 Una "monoterapia" se refiere a un régimen de tratamiento basado en la administración de un compuesto terapéuticamente eficaz, tanto si se administra como una sola dosis como si se administra en varias dosis a lo largo del tiempo.
- 30 La "neoplasia" se refiere a un crecimiento celular anómalo e incontrolado. Un "neoplasma" o tumor es una proliferación anómala, no regulada y desorganizada del crecimiento celular y en general se denomina cáncer. Un neoplasma puede ser benigno o maligno. Un neoplasma es maligno o canceroso si tiene propiedades de crecimiento destructivo, invasividad y metástasis. La invasividad se refiere a la propagación local de un neoplasma mediante la infiltración o la destrucción del tejido circundante, generalmente atravesando las láminas basales que definen los límites de los tejidos, entrando así a menudo en el sistema circulatorio del cuerpo. La metástasis se refiere generalmente a la diseminación de las células tumorales por los sistemas circulatorios linfático o sanguíneo. La metástasis también se refiere a la migración de las células tumorales mediante la extensión directa a través de cavidades serosas, o espacios subaracnoides u otros espacios. A través del proceso de la metástasis, la migración de células tumorales hacia otras áreas del cuerpo establece neoplasmas en áreas alejadas del sitio de aparición inicial.
- 35 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los agentes y los compuestos de esta invención y que no son biológicamente indeseables o indeseables bajo otro punto de vista. En muchos casos, los agentes y los compuestos de esta invención son capaces de formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos cargados, por ejemplo, grupos amino y/o carboxilo cargados o grupos similares. Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos, mientras que las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Para un informe acerca de las sales farmacéuticamente aceptables, (véase Berge *et al.* (1977), J. Pharm. Sci., vol. 66, 1-19).
- 40 Una "pluralidad" significa más de uno.
- 45 Los términos "separado", "purificado", "aislado" y similares significan que uno o más compuestos de una muestra contenidos en un recipiente que porta la muestra se han retirado físicamente, o se han diluido en presencia de uno o más componentes de la muestra distintos presentes en el recipiente. Los componentes de la muestra que pueden ser retirado o diluidos durante una etapa de separación o purificación incluyen productos de reacción químicos, productos químicos no reaccionados, proteínas, carbohidratos, lípidos y moléculas no unidas.
- 50 El término "especie" se utiliza en la presente en diversos contextos, por ejemplo, una especie concreta de agente quimioterapéutico. En cada contexto, el término se refiere a una población de moléculas químicamente indistinguibles del tipo indicado en el contexto concreto.
- 55 "Asociado específicamente", "unido específicamente" y similares se refiere a una interacción específica no aleatoria entre dos moléculas, cuya interacción depende de la presencia de características estructurales, hidrófobas/hidrófilas y/o electrostáticas que permiten la aparición de interacciones químicas o moleculares apropiadas entre las moléculas. Se puede decir que un anticuerpo se "une" o es "reactivo con" (o, de modo equivalente, es "reactivo contra") el epítipo de su antígeno diana. Los anticuerpos se describen habitualmente en la técnica como reactivos

“contra” o “frente” a sus antígenos como abreviatura para indicar la unión del anticuerpo al antígeno.

En la presente, “estable” se refiere a una interacción entre dos moléculas (por ejemplo, un péptido y una molécula de TLR) que sea suficientemente estable, de modo que las moléculas puedan mantenerse para los fines deseados o la manipulación. Por ejemplo, una interacción “estable” entre un péptido y una molécula de TLR se refiere a una interacción en la que el péptido se asocia y permanece asociado con una molécula de TLR durante un periodo de tiempo suficiente para lograr el efecto deseado.

Un “sujeto” o “paciente” se refiere a un animal que necesita un tratamiento que puede ser realizado por las moléculas de la invención. Los animales que pueden ser tratados según la invención incluyen vertebrados, siendo los ejemplos particularmente preferidos los mamíferos, tales como animales bovinos, caninos, equinos, felinos, ovinos, porcinos y primates (que incluyen a primates humanos y no humanos).

Un “marcador sustituto” se refiere a una medición de laboratorio de una actividad biológica dentro del cuerpo que indica de modo indirecto el efecto de un tratamiento sobre un estado de enfermedad. Los ejemplos de marcadores sustitutos para trastornos hiperproliferativos y/o cardiovasculares incluyen SPHK y/o S1PR.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” (o “cantidad eficaz”) se refiere a una cantidad de un ingrediente activo, por ejemplo, un agente según la invención, suficiente para lograr un tratamiento cuando se administra a un sujeto que necesita dicho tratamiento. Por consiguiente, lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición según la invención puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica. En el contexto de la terapia del cáncer, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es la cantidad que produce un cambio objetivamente medido en uno o más parámetros asociados con la supervivencia o el metabolismo de las células cancerosas, que incluyen un aumento o una disminución en la expresión de uno o más genes correlacionada con el cáncer concreto, una reducción en la carga tumoral, la lisis de células cancerosas, la detección de uno o más marcadores de la muerte de células cancerosas en una muestra biológica (por ejemplo, una biopsia y una parte alícuota de un fluido corporal, tal como sangre completa, plasma, suero, orina, etc.), la inducción de la apoptosis u otras vías de muerte celular, etc. Por supuesto, la cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y el trastorno concretos que se están tratando, del peso y la edad del sujeto, de la gravedad del trastorno de enfermedad, del compuesto concreto elegido, del régimen de dosificación que se va a seguir, del momento de la administración, de la vía de administración y similares, todo lo cual puede ser determinado con facilidad por los expertos en la técnica. Se apreciará que, en el contexto de la terapia de combinación, lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente activo concreto puede diferir de lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo cuando se administra como monoterapia (es decir, un régimen terapéutico que emplea sólo una entidad química como ingrediente activo).

El término “tratamiento” o “tratar” significa cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno, que incluye prevenir o proteger frente a la enfermedad o el trastorno (es decir, provocar que no se desarrollen los síntomas clínicos); inhibir la enfermedad o el trastorno (es decir, detener, retrasar o suprimir el desarrollo de síntomas clínicos y/o aliviar la enfermedad o el trastorno (es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos)). Tal como se apreciará, no siempre es posible distinguir entre “prevenir” y “suprimir” una enfermedad o un trastorno porque el acontecimiento o acontecimiento inductivos finales pueden ser desconocidos o estar latentes. Por consiguiente, se entenderá que el término “profilaxis” constituye un tipo de “tratamiento” que incluye “prevenir” y “suprimir”. Así, el término “protección” incluye “profilaxis”.

La expresión “régimen terapéutico” significa cualquier tratamiento de una enfermedad o un trastorno que emplea agentes quimioterapéuticos y citotóxicos, terapia de radiación, cirugía, terapia génica, vacunas y terapia de ADN, terapia de ARNm, terapia antiangiogénica, inmunoterapia, trasplantes de médula ósea, utilización de aptámeros y otros compuestos biológicos, tales como anticuerpos y variantes de anticuerpos, reclamos de receptores y otros compuestos terapéuticos con una base proteica.

Sumario de la invención

La invención, en su forma más amplia, se define mediante las reivindicaciones independientes 1 y 10:

1.- Un reactivo de diagnóstico, que comprende un soporte sólido y un lípido bioactivo derivatizado asociado a él, en el que el lípido bioactivo derivatizado comprende un grupo de cabeza polar y al menos una cadena hidrocarbonada, en el que un átomo de carbono dentro de dicha al menos una cadena hidrocarbonada está derivatizado con un grupo sulfhidrilo colgante y en el que el lípido bioactivo se selecciona del grupo que consiste en un esfingolípido, un metabolito de esfingolípido, un ácido lisofosfatídico y un precursor del ácido lisofosfatídico, en el que el esfingolípido y el metabolito de esfingolípido se selecciona del grupo que consiste en ceramida, ceramida-1-fosfato, N-acetilceramida-1-fosfato, esfinganina, esfingosilfosforilcolina (SPC), dihidroesfingosina, dihidroesfingosina-1-fosfato, y esfingosina-1-fosfato (S1P), en el que el lípido bioactivo está asociado con el soporte sólido a través del grupo sulfhidrilo.

10.- Un método para detectar en una muestra un resto inmunoderivado que se une a un lípido bioactivo seleccionado, que comprende poner en contacto una muestra con un dispositivo de diagnóstico que porta un reactivo de diagnóstico según la reivindicación 1, bajo condiciones que permiten que el resto inmunoderivado, si está

presente, se una al lípido bioactivo derivatizado del reactivo de diagnóstico, en el que el lípido bioactivo que está derivatizado en el reactivo de diagnóstico y el lípido bioactivo seleccionado son el mismo lípido bioactivo.

Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 2-9 y 11-17.

Breve descripción de los dibujos

5 **Figura 1.** Esquema de la síntesis orgánica para fabricar un análogo de S1P tiolado típico que se usó como componente clave de un inmunógeno según la invención, así como componente clave del material de depósito para los ensayos ELISA y BiaCore.

Figura 2. Esquema de la síntesis orgánica para fabricar el ácido graso relacionado tiolado utilizado en la síntesis del análogo de LPA tiolado de la figura 3.

10 **Figura 3.** Esquema de la síntesis orgánica para fabricar el análogo de LPA tiolado que es un componente clave de un inmunógeno según la invención, así como es un componente clave del material de depósito para el ensayo ELISA y otros ensayos.

15 **Figura 4.** El mAb anti-S1P es específico y sensible al S1P y no reconoce a otros lípidos bioactivos similares desde el punto de vista estructural. Panel A: ELISA competitivo con S1P, SPH, LPA, SPC y otros biolípidos similares desde el punto de vista estructural que compiten por la unión de mAb a S1P sobre la placa. Sólo S1P libre o DH-S1P pueden competir por la unión, lo cual demuestra la especificidad del mAb anti-S1P. SPC sólo compete ligeramente por la unión. Panel B: Estructuras de los lípidos bioactivos utilizados en la evaluación de la especificidad.

20 **Figura 5.** Análisis BiaCore de la cinética de unión del mAb anti-S1P a tio-S1P anclado a un chip detector CMS de superficie de maleimida BiaCore. Se aplicaron diversas diluciones de mAb anti-S1P a la célula de flujo para generar sensogramas.

Figura 6. Secuencias de aminoácidos de los dominios V_H y V_L de ratón de Sphingomab™ murino. Los restos de las CDR están recuadrados.

Figura 7. Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los dominios V_H y V_L de Sphingomab™ murino.

25 **Figura 8.** Gráfica que muestra los resultados de ELISA para estudios de unión de anticuerpos Sphingomab™ murino y anticuerpos de unión a S1P quiméricos derivados de Sphingomab™ murino.

Figura 9. ELISA directo que muestra la unión de mAb murinos y quiméricos a placas de ELISA revestidas con un análogo de S1P tiolado según se describe en el ejemplo 6. Los datos muestran que el mAb quimérico (α-S1P IgG) tiene una actuación de unión similar y quizás mayor, comparado con el mAb totalmente murino (mα-S1P IgG).

30 Tal como apreciarán los expertos en la técnica, la siguiente descripción describe ciertas realizaciones preferidas de la invención en detalle y así son sólo representativas y no representan el alcance real de la invención. Antes de describir en detalle la presente invención, se entenderá que la invención no se limita a las moléculas, los sistemas y las metodologías concretas descritas, puesto que pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente se emplea sólo con el objetivo de describir realizaciones concretas y no pretende limitar el alcance de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

35 Descripción detallada de la invención

En la presente se describen composiciones y métodos para generar e identificar anticuerpos contra moléculas de lípidos bioactivos que desempeñan un papel en enfermedades humanas y/o animales como moléculas de señalización. También se describen los propios anticuerpos y los métodos para utilizarlos de modo terapéutico, para el diagnóstico y como reactivos para investigación.

40 1. Métodos para la producción y la identificación de anticuerpos

Se sabe que los lípidos, en general, son una clase particularmente difícil de moléculas para la producción de anticuerpos. La producción de anticuerpos puede describirse en general como un proceso en dos partes: debe proporcionarse un inmunógeno adecuado que generará la respuesta de anticuerpos deseados en un animal y el anticuerpo resultante, si está presente, debe ser detectable.

45 Tal como se analizó anteriormente, la producción eficaz de anticuerpos requiere la generación de anticuerpos y la detección de anticuerpos. Tal como se describe en los ejemplos que aparecen en la presente a continuación, se ha logrado la generación de anticuerpos dirigidos a ciertos lípidos bioactivos utilizando un lípido bioactivo derivatizado como inmunógeno. En los ejemplo, un análogo de lípido bioactivo tiolado (por ejemplo, S1P) se conjuga con hemocianina de lapa (KLH) o albúmina de suero bovina sin ácidos grasos (BSA) a través de SMCC (Pierce, Rockford, IL) utilizando los protocolos recomendados por el fabricante. SMCC es un entrecruzador heterobifuncional que reacciona con aminas primarias y grupos sulfhidrilo y representa un entrecruzador preferido. También puede
50 utilizarse yodoacetamida (IOA) para proteínas activadas por maleimida.

Sin embargo, también pueden utilizarse otros inmunógenos y métodos para generar anticuerpos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se han generado anticuerpos contra especies de fosfolípidos mediante una inmunización con liposomas (Maneta-Peyret *et al.*, 1988, 1989; Benerji y Alving, 1990) o mediante adsorción de fosfolípidos monoméricos a proteínas (Tamamura *et al.*, 1971; Maneta-Peyret *et al.*, 1989), a bacterias (Umeda *et al.*, 1989), a acrilamida (Maneta-Peyret *et al.*, 1988, 1989) y a oro (Tomii *et al.* (1991), *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 44:75-80). En muchos casos, la presentación del lípido bioactivo en forma de emulsiones o complejos liposómicos ha producido IgM con especificidad, sensibilidad y/o actividad biológica limitadas en comparación con IgG. Por ejemplo, se han caracterizado dos reactivos disponibles en el mercado supuestamente específicos para la ceramida, uno es un suero de ratón policlonal enriquecido en IgM y el otro es un anticuerpo monoclonal IgM. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal era específico para la esfingomielina y que el antisuero reaccionaba con diversas especies de ceramidas en el intervalo nanomolar (Vielhaber G. *et al.* (2001), *Glycobiology*, 11:451-457). En una estrategia diferente (Ran *et al.* (2005), *Clin. Cancer Res.*, 11:1551-1562), se emplearon células endoteliales b.End3 que se habían tratado con peróxido (que pretende provocar la translocación de fosfolípidos aniónicos hacia la superficie externa de las células) como inmunógeno para provocar la generación de anticuerpos específicos para fosfolípidos aniónicos. Así, se conocen numerosos métodos mediante los cuales puede provocarse una respuesta de anticuerpos contra una diana antigénica deseada; cualquiera de estos puede utilizarse en la presente invención con la condición de que los anticuerpos resultantes puedan detectarse y se demuestre que son reactivos con el lípido bioactivo deseado.

La generación de anticuerpos, que por supuesto es necesaria, no es suficiente si el anticuerpo no puede detectarse. Así, una faceta de la invención se basa en la apreciación de que los fallos previos de otros para producir anticuerpos contra lípidos bioactivos pueden atribuirse al menos a defectos en la etapa de detección. Este problema de detección se ha solucionado de forma elegante en los siguientes ejemplos mediante el uso de un lípido bioactivo derivatizado. El lípido bioactivo derivatizado se emplea para detectar e identificar un anticuerpo reactivo contra un epitopo del lípido bioactivo concreto presente en el inmunógeno utilizado para generar los anticuerpos que se están detectando; el lípido bioactivo utilizado para la detección en forma derivatizada contiene el mismo epitopo contra el cual se generaron los anticuerpos. Para desempeñar este papel, el lípido derivatizado puede asociarse con la fase sólida de un dispositivo de ensayo, tal como una placa de ELISA, un chip detector BiaCore, etc. En algunas realizaciones, el lípido bioactivo derivatizado está covalentemente conjugado directamente al soporte sólido. Como ejemplo, el lípido derivatizado puede estar covalentemente conjugado con un chip BiaCore activado, según se describe en los siguientes ejemplos. En otras realizaciones, el lípido bioactivo derivatizado está covalentemente conjugado con un resto portador, produciendo un "conjugado de lípido bioactivo derivatizado" que después se une a un soporte sólido. Como ejemplo, se emplea un lípido derivatizado covalentemente conjugado con BSA como material de depósito (material de captura) para un ELISA, según se describe en los siguientes ejemplos. En otra realización, la unión del lípido bioactivo derivatizado al soporte sólido proporciona un medio de detección estable que no se probable que se elimine con el lavado, que es un riesgo presente en algunos métodos de detección. La detección del anticuerpo puede lograrse mediante una diversidad de formas. En una realización preferida de la invención, la detección se realiza mediante los sistemas de análisis de interacción sin marcadores ELISA, BiaCore™ u otros medios de detección habituales con una base de soporte sólido en los cuales el lípido bioactivo derivatizado se une a dicho soporte sólido. Los ejemplos de otros soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a columnas de afinidad, esferas de vidrio o sintéticas, placas de múltiples pocillos y similares.

El conjugado de lípido bioactivo derivatizado utilizado en la etapa de detección puede ser el mismo conjugado de lípido bioactivo derivatizado utilizado como inmunógeno, o el lípido bioactivo derivatizado puede conjugarse con un portador diferente que en el conjugado utilizado como inmunógeno. En algunas realizaciones, por ejemplo, como depósito para ELISA se prefiere utilizar un conjugado de lípido bioactivo derivatizado diferente en la etapa de detección que el que se utilizó como inmunógeno para minimizar la reactividad cruzada. Como ejemplo, el portador puede ser BSA (preferiblemente sin ácidos grasos, en particular en la etapa de detección), KLH u otros portadores conocidos en la técnica. El entrecruzador utilizado para conjugar el lípido bioactivo derivatizado al portador proteico puede ser, por ejemplo, SMCC o IOA. En una realización preferida, el inmunógeno es S1P-IOA-KLH y S1P-SMCC-BSA (BSA sin ácidos grasos) es el material de depósito de captura en el ELISA, refiriéndose S1P al S1P derivatizado que reacciona con el entrecruzador (IOA o SMCC en este caso) para formar un enlace covalente con la proteína portadora (KLH o BSA en este caso).

2. Compuestos

El término "anticuerpo" ("Ab") o "inmunoglobulina" (Ig) se refiere a cualquier forma de un péptido, un polipéptido derivado, modelado o codificado por un gen de inmunoglobulina, o cualquiera de sus fragmentos, capaz de unirse a un antígeno o a un epitopo. Véase, por ejemplo, IMMUNOBIOLOGY, 5ª edición, C.A. Janeway, P. Travers, M., Walport, M.J. Shlomchik, ed. Garland Publishing (2001). Las moléculas de anticuerpos o inmunoglobulinas son grandes moléculas de glicoproteínas con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, normalmente compuestas por dos tipos diferentes de cadenas polipeptídicas. Una cadena polipeptídica, denominada la cadena "pesada" (H), tiene aproximadamente 50 kDa. El otro polipéptido, denominado la cadena "ligera" (L), tiene aproximadamente 25 kDa. Cada molécula de inmunoglobulina normalmente consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro, cuyo número varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente. En cualquier molécula de anticuerpo natural, las dos cadenas

pesadas y las dos cadenas ligeras son idénticas y portan dos sitios idénticos de unión al antígeno y así se dice que son divalentes, es decir, tienen la capacidad de unir simultáneamente dos moléculas idénticas.

5 Las cadenas "ligeras" de las moléculas de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden clasificarse en dos tipos claramente diferenciados, kappa (κ) y gamma (γ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. La proporción de los dos tipos de cadena ligera varía de una especie a otra. Como ejemplo, la proporción media de κ a γ es de 20:1 en ratones, mientras que en seres humanos es de 2:1 y en ganado bovino es de 1:20.

10 Las cadenas "pesadas" de las moléculas de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden clasificarse en uno de cinco tipos claramente diferenciados, denominados isotipos, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Algunos isotipos tienen varios subtipos. Las cinco clases principales de inmunoglobulinas son inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA), e inmunoglobulina E (IgE). La IgG es el isotipo más abundante y tiene varias subclases (IgG1, 2, 3 y 4 en seres humanos). El fragmento Fc y las regiones bisagra se diferencian en anticuerpos de diferente isotipo, determinando así sus propiedades funcionales. Sin embargo, la organización global de los dominios es similar en todos los isotipos.

15 Tal como se emplea en la presente, un "fragmento de anticuerpo" y sus variantes gramaticas se refieren a una porción de un anticuerpo intacto que incluye el sitio de unión al antígeno o regiones variables de un anticuerpo intacto, en el que la porción puede estar exenta de los dominios constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH2, CH3 y CH4) de la región Fc del anticuerpo intacto. Como alternativa, las porciones de los dominios constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH2, CH3 y CH4) pueden estar incluidas en el "fragmento de anticuerpo". Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos son los que conservan la unión al antígeno e incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y Fv; diacuerpos; triacuerpos; moléculas de anticuerpos monocatenarios (sc-Fv); minicuerpos, nanocuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Como ejemplo, un fragmento Fab también contiene el dominio constante de una cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada.

20 La expresión "región variable" se refiere a una secuencia N-terminal de la molécula de anticuerpo o de cualquiera de sus fragmentos. En general, cada una de las cuatro cadenas tiene una región variable (V) en su porción amino-terminal, que contribuye al sitio de unión al antígeno y una región constante (C), que determina el isotipo. Las cadenas ligeras están unidas a las cadenas pesadas mediante muchas interacciones no covalentes y mediante enlaces disulfuro y las regiones V de las cadenas pesada y ligera se emparejan en cada brazo de la molécula de anticuerpo para generar dos sitios de unión al antígeno idénticos. Se cree que algunos restos aminoácidos forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991); Clothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, vol. 186:651 (1985)).

35 Debe advertirse que la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos, sino que está concentrada en tres segmentos denominados "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) o "regiones hipervariables", en ambos dominios variables de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan "regiones de marco" (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR conectadas por tres CDR. Las CDR en cada cadena son mantenidas juntas y cercanas por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). De forma colectiva, las 6 CDR contribuyen a las propiedades de unión de la molécula de anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprenda sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno (véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994)).

40 La expresión "dominio constante" se refiere a la región C-terminal de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo. En general, los dominios constantes no están directamente implicados en las propiedades de unión de una molécula de anticuerpo a un antígeno sino que muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos. En este caso, las "funciones efectoras" se refieren a los diferentes efectos fisiológicos de los anticuerpos (por ejemplo, opsonización, lisis celular, desgranulación de células cebadas, basófilos y eosinófilos y otros procesos) mediados por el reclutamiento de células inmunológicas por la interacción molecular entre el dominio Fc y las proteínas del sistema inmunológico. El isotipo de la cadena pesada determina las propiedades funcionales del anticuerpo. Sus propiedades funcionales diferenciadas son conferidas por las porciones carboxi-terminales de las cadenas pesadas, cuando no están asociadas con cadenas ligeras.

55 El término "variante" se refiere a una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la secuencia de aminoácidos nativa de un anticuerpo en al menos una modificación de un resto aminoácido. Una secuencia de aminoácidos nativa o de origen o de tipo salvaje se refiere a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que se encuentra en la naturaleza. Un "variante" de la molécula de anticuerpo incluye, pero no se limita a cambios dentro de una región

variable o una región constante de una cadena ligera y/o una cadena pesada, incluyendo en la región Fc, la región Fab, el dominio CH₁, el dominio CH₂, el dominio CH₃ y la región bisagra.

El término "específico" se refiere a la unión selectiva de un anticuerpo a su epitopo diana. Las moléculas de anticuerpos pueden ensayarse para la especificidad de unión comparando la unión al antígeno deseado con la unión a un antígeno no relacionado o a un antígeno análogo o una mezcla de antígenos bajo un conjunto dado de condiciones. Preferiblemente, un anticuerpo según la invención carece de unión significativa a antígenos no relacionados, e incluso a análogos del antígeno diana. En este caso, el término "antígeno" se refiere a una molécula que es reconocida por una molécula de anticuerpo y se une a él o a un resto inmunoderivado que se une al antígeno. La porción específica de un antígeno que se une a un anticuerpo se denomina "epitopo". Un "hapteno" se refiere a una molécula pequeña que, bajo la mayoría de circunstancias, puede provocar una respuesta inmunológica (es decir, actúa como un antígeno) sólo cuando está unida a un portador, por ejemplo, una proteína, polietilenglicol (PEG), oro coloidal, esferas de sílicona y similares. El portador también puede ser un portador que no provoque una respuesta inmunológica por sí mismo.

El término "anticuerpo" se emplea en el sentido más amplio, e incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos, en los que cada brazo del anticuerpo es reactivo con un epitopo diferente del mismo antígeno o de diferentes antígenos), minicuerpos, heteroconjugados, diacuerpos, triacuerpos, anticuerpos quiméricos y sintéticos, así como fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno con una propiedad de unión y/o actividad biológica deseadas.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo, o a una población de anticuerpos, obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe considerarse que sea necesaria la producción del anticuerpo mediante un método concreto. Por ejemplo, pueden fabricarse anticuerpos monoclonales mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler G. y Milstein C. (1975), *Nature*, vol. 256:495-497, o mediante métodos de ADN recombinante.

El término anticuerpo (o inmunoglobulina) "quimérico" se refiere a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera que es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivadas de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (Cabilly, *et al.*, *infra*; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 81:6851 (1984)).

La expresión "anticuerpo humanizado" significa anticuerpos humanos que también contienen secuencias seleccionadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) en lugar de las secuencias humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones de aminoácidos conservativas o restos no naturales de la misma especie o de una especie diferente que no alteren significativamente su actividad de unión y/o biológica. Estos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son reemplazados por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un especie de ratón, rata, camello, bovina, de cabra o conejo que tenga las propiedades deseadas. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de marco importadas. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar y maximizar aún más la actuación del anticuerpo. Así, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá al menos uno y en un aspecto dos dominios variables, en los que todos los dominios o todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc) o de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente de EEUU nº 4.816.567; Cabilly *et al.*, patente europea nº 0.125.023 B1; Boss. *et al.*, patente de EEUU nº 4.816.397; Boss *et al.*, patente europea nº 0.120.694 B1; Neuberger *et al.*, WO 86/01533; Neuberger *et al.*, patente europea nº 0.194.276 B1; Winter, patente de EEUU nº 5.225.539; Winter, patente europea nº 0.239.400 B1; Padlan *et al.*, solicitud de patente europea nº 0.519.596 A1; Queen *et al.* (1989), *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.*, vol. 86:10029-10033).

La expresión anticuerpo "totalmente humano" puede referirse a un anticuerpo producido en un ratón genéticamente modificado (es decir, transgénico) (por ejemplo, de Medarex) que, cuando se le presenta un inmunógeno, puede producir un anticuerpo humano que no requiera necesariamente el injerto de CDR. Estos anticuerpos son totalmente humanos (100% de secuencias de proteínas humanas) procedentes de animales, tales como ratones, en los que los genes no humanos del anticuerpo son suprimidos y reemplazados con una expresión de genes de anticuerpos humanos. Los solicitantes creen que pueden generarse anticuerpos contra lípidos bioactivos cuando se presentan a estos ratones genéticamente modificados o a otros animales que puedan ser capaces de producir marcos humanos para las CDR pertinentes.

La expresión "anticuerpo biespecífico" puede referirse a un anticuerpo, o a un anticuerpo monoclonal, que tiene propiedades de unión al menos a dos epitopos diferentes. En una realización, los epitopos proceden del mismo

antígeno. En otra realización, los epitopos proceden de dos antígenos diferentes. Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos biespecíficos de modo recombinante utilizando la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulinas. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Los expertos en la técnica pueden producir anticuerpos biespecíficos empleando estos u otros métodos como se conoce en la técnica. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Un ejemplo de un anticuerpo biespecífico incluido en esta invención es un anticuerpo que tiene propiedades de unión a un epitopo de S1P y un epitopo de LPA y así es capaz de reconocer y unirse a S1P y LP1. Otro ejemplo de un anticuerpo biespecífico incluido en esta invención es un anticuerpo que tiene propiedades de unión a un epitopo de un lípido bioactivo y a un epitopo de un antígeno de la superficie celular. Así, el anticuerpo es capaz de reconocer y unirse al lípido bioactivo y es capaz de reconocer y unirse a células, por ejemplo, con el objetivo de lograr un transporte dirigido.

La expresión "anticuerpo heteroconjugado" puede referirse a dos anticuerpos unidos covalentemente. Estos anticuerpos puede prepararse utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, e incluyen la utilización de agentes entrecruzadores. Tal como se emplea en la presente, el término "conjugado" se refiere a moléculas formadas mediante la unión covalente de uno o más fragmentos de anticuerpos o restos de unión a una o más moléculas poliméricas.

La expresión "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epitopo deseado y, de alguna manera, ejercer un efecto biológico. Los efectos biológicos incluyen, pero no se limitan a la modulación de una señal de crecimiento, la modulación de una señal antiapoptótica, la modulación de una señal apoptótica, la modulación de la cascada de la función efectora y la modulación de otras interacciones de ligandos.

La expresión "ADN recombinante" se refiere a ácidos nucleicos y a productos génicos expresados a partir de estos que se han manipulado, creado o modificado por el ser humano. Los polipéptidos o las proteínas "recombinantes" son polipéptidos o proteínas producidos mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, a partir de células transformadas con una construcción de ADN exógeno que codifica el polipéptido o la proteína deseados. Los polipéptidos o las proteínas "sintéticos" son los polipéptidos o las proteínas preparados mediante síntesis química.

La expresión "módulo de expresión" se refiere a una molécula de nucleótidos capaz de llevar a cabo la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia que codifica una proteína, tal como un anticuerpo de la invención) en un hospedante compatible con dichas secuencias. Los módulos de expresión incluyen al menos un promotor unido operablemente con la secuencia codificadora del polipéptido y, opcionalmente, con otras secuencias, por ejemplo, señales de terminación de la transcripción. También pueden emplearse otros elementos reguladores necesarios o útiles para llevar a cabo la expresión, por ejemplo, potenciadores. Así, los módulos de expresión incluyen plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector de "ADN desnudo" y similares.

Un "vector" o "plásmido" o "vector de expresión" se refiere a un ácido nucleico que pueden mantenerse de forma transitoria o estable en una célula para llevar a cabo la expresión de uno o más genes recombinantes. Un vector puede comprender un ácido nucleico, solo o complejo con otros compuestos. Un vector comprende opcionalmente ácidos nucleicos y/o proteínas víricas o bacterianas y/o membranas. Los vectores incluyen, pero no se limitan a replicones (por ejemplo, replicones de ARN, bacteriófagos) a los cuales pueden unirse fragmentos de ADN y ser replicados. Así, los vectores incluyen, pero no se limitan a ARN, ADN o ARN lineal o circular autorreplicante autónomo, e incluyen plásmidos de expresión y no expresión. Los "plásmidos" pueden estar disponibles en el mercado, disponibles al público sin restricciones, o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles divulgados con protocolos publicados. Además, los vectores de expresión también pueden contener un gen que proporcione un rasgo fenotípico para la selección de células hospedantes transformadas, tales como la resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para cultivos de células eucariotas, o tales como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El término "promotor" incluye todas las secuencias capaces de conducir la transcripción de una secuencia codificadora en una célula. Así, los promotores utilizados en las construcciones de la invención incluyen elementos de control transcripcional de acción en cis y secuencias reguladoras implicadas en la regulación o la modulación de la programación y/o la velocidad de transcripción de un gen. Por ejemplo, un promotor puede ser un elemento de control transcripcional de acción en cis, que incluye un potenciador, un promotor, un terminador de la transcripción, un origen de la replicación, una secuencia de integración cromosómica, regiones no traducidas 5' y 3', o una secuencia intrónica, que están implicados en la regulación transcripcional. Las regiones reguladoras transcripcionales adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan al potenciador/promotor temprano de citomegalovirus (CMV) humano, el potenciador/promotor temprano de SV40, los promotores lac o trp de *E. coli* y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o sus virus.

A. Anticuerpos contra esfingolípidos

En la presente se describen métodos para preparar anticuerpos dirigidos contra ciertos lípidos bioactivos, incluyendo esfingolípidos. El término "esfingolípido" se refiere a los esfingolípidos definidos en <http://www.lipidmaps.org>, que incluyen los siguientes: bases esfingoides (incluyendo esfing-4-eninas (esfingosinas), esfinganinas, 4-hidroxi esfinganinas (fitoesfingosinas), homólogos y variantes de bases esfingoides, bases esfingoides-1-fosfato, lisoesfingomielinas y lisoglicoesfingolípidos; bases esfingoides N-metiladas y análogos de bases esfingoides); ceramidas (que incluyen N-acilesfingosinas (ceramidas), N-acilesfinganinas (dihidroceraidas), N-acil-4-hidroxi esfinganinas (fitoceraidas), acilceramidas y ceramidas-1-fosfato); fosfoesfingolípidos (que incluyen ceramidafosfocolinas (esfingomielinas), ceramidafosfoetanolaminas y ceramidafosfoinositoles; fosfoesfingolípidos; glicoesfingolípidos neutros (incluyendo la serie sencilla de Glc (GlcCer, LacCer, etc., GalNAcb1-3Gala1-4Galb1-4Glc- (serie Globo), GalNAcb1-4Galb1-4Glc- (serie Ganglio), Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (serie Lacto), Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (serie Neolacto), GalNAcb1-3Gala1-3Galb1-4Glc- (serie Isoglobo), GlcNAcb1-2Mana1-3Mana1-4Glc- (serie Mollu), GalNAcb1-4GlcNAcb1-3Manb1-4Glc- (serie Artro), Gal- (serie Gala) u otros glicoesfingolípidos neutros); glicoesfingolípidos ácidos (que incluyen gangliósidos, sulfoglicoesfingolípidos (sulfatidas), glucuronoesfingolípidos, fosfoglicoesfingolípidos y otros glicoesfingolípidos ácidos; glicoesfingolípidos básicos; glicoesfingolípidos anfóteros; arsenoesfingolípidos y otros esfingolípidos.

Los anticuerpos anti-esfingolípidos son útiles para tratar o prevenir trastornos, tales como trastornos hiperproliferativos y cardiovasculares o enfermedades o trastornos cerebrovasculares, según se describe con más detalle a continuación. En realizaciones concretas, la invención se dirige a métodos para preparar anticuerpos contra S1P y sus variantes, que incluyen la propia S1P (definida como esfingosina-1-fosfato (esfingen-1-fosfato; D-eritro-esfingosina-1-fosfato; esfing-4-enina-1-fosfato; ácido (E,2S,3R)-2-amino-3-hidroxi octadec-4-enoxi]fosfónico) (CAS 26993-30-6)), o DHSIP (definido como dihidro-esfingosina-1-fosfato (esfinganina-1-fosfato); ácido [(2S,3R)-2-amino-3-hidroxi octadecoxi]fosfónico; D-eritro-dihidro-D-esfingosina-1-fosfato) (CAS 19794-97-9)). También pueden ser útiles anticuerpos contra SPC (definido como esfingosilfosforilcolina, lisoesfingomielina, esfingosilfosfocolina, esfingosinafosforilcolina, etanaminio; cloruro de 2-(((2-amino-3-hidroxi-4-octadecenil)oxi)hidroxifosfinil)oxi)-N,N,N-trimetilo, cloruro de (R-(R*,S*(E))),2-(((E,2R,3S)-2-amino-3-hidroxi octadec-4-enoxi]hidroxifosforil)oxieti-1-trimetilazano (CAS 10216-23-6)).

1. Un anticuerpo monoclonal anti-S1P preferido

Se describe un anticuerpo anti-S1P monoclonal específico (mAb anti-S1P). Este anticuerpo puede utilizarse como esponja molecular terapéutica para absorber selectivamente a S1P y así disminuir las concentraciones extracelulares *in vivo* eficaces de este factor proangiogénico, profibrótico y facilitador de tumores. Esto puede dar como resultado la reducción del volumen tumoral y del potencial metastásico, así como el bloqueo simultáneo de la formación de nuevos vasos sanguíneos que, de otra forma, alimentarían al tumor en crecimiento. Este anticuerpo (y las moléculas que tienen una actividad equivalente) también puede utilizarse para tratar otros trastornos hiperproliferativos influidos por S1P, que incluyen la proliferación de células endoteliales no deseada que aparece, por ejemplo, en la degeneración macular relacionada con el envejecimiento, así como en muchos cánceres. Además, la capacidad de S1P para proteger a las células de la apoptosis puede ser invertida por agentes, tales como los anticuerpos y esto produce un aumento en la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos proapoptóticos convencionales.

B. Anticuerpos contra otros lípidos bioactivos de señalización

Los métodos descritos en la presente pueden utilizarse para preparar anticuerpos monoclonales contra muchos otros lípidos bioactivos extracelulares e intracelulares además de los esfingolípidos (por ejemplo, SPC, ceramida, esfingosina, esfinganina, S1P y dihidro-S1P). Otras clases de lípidos bioactivos incluyen los leucotrienos, eicosanoides, metabolitos de eicosanoides (tales como los HETE, prostaglandinas, lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienoicos e isoeicosanoides), mediadores de cannabinoides no eicosanoides, fosfolípidos y sus derivados, tales como ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilglicerol (PG), cardiolipinas y lisofosfolípidos, tales como lisofosfatidilcolina (LPC) y ácido lisofosfatídico (LPA). En resumen, esta invención puede adaptarse para la aplicación a cualquier lípido bioactivo de señalización extracelular y/o intracelular deseado con efectos pleiotrópicos sobre importantes procesos celulares. Otros ejemplos de lípidos bioactivos incluyen fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PEA), diacilglicérido (DG), sulfatidas, gangliósidos, globósidos y cerebrósidos.

C. Conjugados

Un anticuerpo monoclonal, o su fragmento de unión al antígeno, descrito en la presente puede utilizarse por sí solo *in vitro* o puede administrarse a un sujeto, en formas no derivatizadas o no conjugadas. En otras realizaciones, dichos anticuerpos, derivados y variantes pueden derivatizarse o unirse a una o más entidades moleculares. Otras entidades moleculares incluyen péptidos, polipéptidos y proteínas naturales, recombinantes o sintéticas, compuestos químicos no peptídicos, tales como isótopos, compuestos terapéuticos de molécula pequeña, etc. Las moléculas pequeñas preferidas incluyen radiomarcadores, agentes fluorescentes y agentes quimioterapéuticos de molécula pequeña. Las proteínas preferidas incluyen factores del crecimiento, citoquinas y anticuerpos (incluyendo anticuerpos idénticos y los derivados o variantes de dichos anticuerpos). Los ingredientes activos pueden unirse

mediante cualquier método adecuado, tomando en cuenta los ingredientes activos y la aplicación prevista, entre otros factores. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de la invención puede unirse funcionalmente a otra molécula mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente, u otra estrategia adecuada.

5 Así, la invención contempla conjugados formados entre uno o más anticuerpos monoclonales de la invención, o uno de sus variantes o derivados, con otro ingrediente activo. Estos conjugados pueden ser covalentes o no covalentes y pueden producirse a través de un conector o directamente entre los ingredientes activos. Los ejemplos de dichos conjugados incluyen uno o más anticuerpos monoclonales de la invención (o su dominio de unión al antígeno) unidos a otro anticuerpo monoclonal terapéutico de la misma clase o de una clase diferente. Como alternativa, el anticuerpo monoclonal o derivado o variante del anticuerpo de la invención puede estar unido a una clase diferente de agente terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico de molécula pequeña o un radioisótopo. En algunas realizaciones, uno o más de cada uno de los dos o más agentes terapéuticos diferentes (al menos uno de los cuales es un compuesto de la invención) puede unirse a través de un andamiaje multivalente.

10 Como alternativa a los conjugados, un anticuerpo monoclonal o un derivado o variante del anticuerpo de la invención puede estar asociado simplemente con uno o más agentes terapéuticos. Como ejemplo, un anticuerpo monoclonal de la invención puede combinarse con uno o más tipos distintos de agentes terapéuticos en un vehículo de transporte, por ejemplo, un liposoma, una micela, una nanopartícula, etc., adecuado para la administración a un sujeto.

15 La invención también contempla conjugar un anticuerpo monoclonal o un derivado o variante del anticuerpo de la invención, por ejemplo, una o más CDR reactivas contra un lípido bioactivo diana concreto, con una proteína o un polipéptido. Como ejemplo, una o más CDR de la región variable de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina puede injertarse en un anticuerpo monoclonal.

3. Aplicaciones

25 En la presente se describen composiciones y métodos para tratar o prevenir trastornos hiperproliferativos, tales como cáncer, fibrosis y angiogénesis y enfermedades y trastornos cardiovasculares, cardíacos y otras enfermedades, trastornos, o traumatismos físicos y/o enfermedades y trastornos cerebrovasculares, en los que los agentes terapéuticos se administran a un paciente y alteran la actividad o la concentración de lípidos indeseables, tóxicos y/o bioactivos, o sus precursores o metabolitos. Los métodos y las composiciones terapéuticos actúan cambiando la concentración absoluta, relativa y/o disponible y/o las actividades de ciertos lípidos indeseables o tóxicos. En este caso, "tóxico" se refiere a la implicación de un lípido concreto en un proceso de enfermedad, por ejemplo, como molécula de señalización.

30 Aunque no se pretenda limitación alguna por ninguna teoría concreta, se cree que unas concentraciones inapropiadas de lípidos, tales como LPA y/o sus metabolitos, causan o contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades y trastornos, que incluyen enfermedad cardíaca, dolor neuropático, cáncer, angiogénesis, inflamación y enfermedad cerebrovascular, que incluye patologías del oído interno similares al ictus (véase, por ejemplo, Scherer, *et al.* (2006), Cardiovascular Research, vol. 70:79-87). Como tales, las presentes composiciones y métodos pueden utilizarse para tratar estas enfermedades y trastornos, en particular disminuyendo la concentración eficaz *in vivo* de un lípido diana concreto, por ejemplo, LPA. A continuación se describen varias clases de enfermedades que pueden ser tratadas según los métodos descritos.

A. Enfermedades y trastornos hiperproliferativos

40 i. Cáncer

Una estrategia para la terapia del cáncer es reducir los niveles extracelulares biológicamente disponibles del promotor tumoral S1P, como única terapia o en combinación con tratamientos anticáncer tradicionales, que incluyen la administración de agentes quimioterapéuticos, tales como una antraciclina. Para este fin, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal (mAb) que es específico para S1P, que puede adsorber selectivamente la S1P del suero, actuando con una esponja molecular para neutralizar la S1P extracelular. Puesto que se ha demostrado que S1P es proangiogénica, un beneficio añadido a la eficacia del anticuerpo puede derivarse de la capacidad del anticuerpo de privar del suministro sanguíneo al tumor en crecimiento. Así, otra estrategia antineoplásica basada en esfingolípidos implica combinar activadores conocidos de la producción de CER y SPH (doxorubicina y glicósidos de antraciclina relacionados, terapia de radiación, etc.) acoplado con una estrategia para reducir los niveles de S1P.

50 Aunque se han propuesto estrategias anticáncer basadas en esfingolípidos que se dirigen a enzimas clave de la vía metabólica de los esfingolípidos, tales como SPHK, la propia S1P no se ha enfatizado, en gran medida debido a las dificultades para atacar esta diana y dianas relacionadas. Tal como se describe en la presente, se ha producido un anticuerpo monoclonal muy específico contra S1P que reconoce a S1P en el intervalo fisiológico y es capaz de neutralizar a S1P mediante combinación molecular. El uso de este anticuerpo (y sus derivados) priva a las células tumorales en crecimiento de un importante factor del crecimiento y la supervivencia. Además, el uso de dicha terapia del cáncer basada en anticuerpos también podría ser eficaz cuando se emplea en combinación con tratamientos del cáncer convencionales, tales como cirugía, terapia de radiación y/o la administración de agentes anticáncer citotóxicos. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, la familia de fármacos de la antraciclina, los

vinca-alcaloides, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, los taxanos, las epitolonas, discodermolida, la familia de fármacos de la pteridina, diinenos y las podofilotoxinas. Los miembros de estas clases incluyen, por ejemplo, doxorubicina, carminomicina, daunorrubicin, aminopterina, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, mitomicina C, porfiromicina, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, gemcitabina, citosina arabinósido, podofilotoxina o derivados de podofilotoxina, tales como etopósido, etopósido fosfato o tenipósido, melfalano, vinblastina, vincristina, leurosidina, vindesina, leurosina, paclitaxel y similares. Otros agentes antineoplásicos incluyen estramustina, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, bleomicina, gemcitabina, ifosamida, melfalano, hexametilmelamina, tiotepa, citarabina, idatrexato, trimetrexato, dacarbazina, L-asparaginasa, camptotecina, CPT-11, topotecano, ara-C, bicalutamida, flutamida, leuprolida, derivados de piridobenzoindol, interferones e interleuquinas. Otros fármacos citotóxicos son muy conocidos en la técnica. Una terapia de combinación basada en anticuerpos puede mejorar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos sensibilizando a las células frente a la apoptosis mientras que minimizan sus efectos secundarios tóxicos, aunque la administración del anticuerpo por sí solo también puede resultar eficaz para retrasar el avance de la enfermedad. En efecto, la capacidad del mAb anti-S1P para retrasar el avance del tumor en modelos de ratón de cáncer humano y en modelos de ratón de aloinjertos demuestra la utilidad de las estrategias de anticuerpos anti-S1P para tratar tumores humanos y animales. Además, el descubrimiento de que varios tipos de cánceres humanos (por ejemplo, de ovario, mama, pulmón y melanoma) pueden tratarse en modelos de xenoinjerto demuestra que las estrategias de anticuerpos anti-S1P no se limitan a un tipo de célula o tejido canceroso.

El LPA media en múltiples respuestas celulares, que incluyen la proliferación, la diferenciación, la angiogénesis y la movilidad celular. Un gran conjunto de descubrimientos experimentales sugiere que el LPA extracelular desempeña un papel clave en el avance de varios tipos de cáncer humano mediante la estimulación de la proliferación, la supervivencia y la invasión de células tumorales y mediante la inducción de la angiogénesis y la metástasis. Además, el LPA protege a una diversidad de tipos de células tumorales frente a la apoptosis. Desde hace tiempo, el LPA se ha asociado con cáncer de ovario y de mama (Fang, X., *et al.* (2002), *Biochim. Biophys. Acta*, 1582:257-64); se han descubierto unos niveles altos de LPA en sangre y líquido de ascitis de pacientes y se han correlacionado con el avance, la angiogénesis y el potencial metastásico del tumor. Además, la autotoxina (ATX), enzima principalmente responsable de la producción de LPA, se ha correlacionado con las propiedades metastásicas e invasivas de tumores humanos, incluyendo melanoma, cáncer de pulmón, neuroblastoma, carcinoma hepatocelular y glioblastoma multiforme. Así, se reconoce que LPA es una diana innovadora y prometedora para la terapia del cáncer (Mills, G.B. y W.H. Moolenaar (2003), *Nat. Rev. Cancer*, 3:582-91).

Se cree que la neutralización del LPA con un anticuerpo anti-LPA (tal como el descrito en la presente) será una nueva estrategia terapéutica antiangiogénica y antimetastásica para el tratamiento del cáncer. Se cree que los anticuerpos monoclonales contra LPA actúan como "esponja" para unirse selectivamente a LPA y así disminuir los niveles extracelulares *in vivo* eficaces de LPA. Se cree que esto dará como resultado la reducción de la tumorigénesis y el crecimiento tumoral, así como el bloqueo simultáneo de la formación de vasos sanguíneos y del potencial metastásico. Además, es probable que el LPA pierda su capacidad para proteger a las células frente a la apoptosis como resultado de la neutralización por los anticuerpos, aumentando así la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos proapoptóticos convencionales.

ii. Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. Ahora se cree que la angiogénesis asociada con tumores sólidos y en circulación es un componente crucial de la tumorigénesis puesto que, en la actualidad, la opinión de que el crecimiento del tumor depende de la neovascularización está científicamente bien aceptada. Tanto S1P como LPA parecen ser importantes para el proceso angiogénico.

El LPA es el principal regulador de $GRO\alpha$, un oncogén que se cree que contribuye a la tumorigénesis a través de su efecto proangiogénico (Lee, *et al.* (2006), *Cancer Res.*, vol. 66:2740-8). El LPA también potencia la expresión de la metaloproteinasas de matriz-2, un actor reconocido en la migración celular subyacente al proceso angiogénico (Wu, *et al.* (2005), *Endocrinology*, vol. 146:3387-3400).

La S1P estimula la síntesis de UNA y la movilidad quimiotáctica de las células endoteliales venosas humanas (HUVEC), al mismo tiempo que induce la diferenciación de estructuras multicelular que es fundamental para la formación de vasos sanguíneos tempranos. La S1P también estimula la migración de precursores de células endoteliales derivadas de la médula ósea hacia sitios de neovascularización y las células que sobreexpresan receptores de S1P son resistentes a los agentes antiangiogénicos talidomida y neovastato. Así, S1P y en particular los receptores de S1P, son necesarios para la angiogénesis y la neovascularización. Por último, se produce un entrecruzamiento entre S1P y otros factores del crecimiento proangiogénicos, tales como VEGF, EGF, PDGF, bFGF, e IL-8. Por ejemplo, S1P transactiva los receptores de EGF y VEGF2 y VEGF sobreexpresa la expresión del receptor de S1P (Igarashi, *et al.* (2003), *PNAS* (EE.UU.), vol. 100:10664-10669).

Tal como se apreciará, el control clínico de la angiogénesis es un componente crítico para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis, tales como la degeneración macular relacionada con el envejecimiento (AMD) y la endometriosis. Los compuestos terapéuticos antiangiogénicos también son

particularmente atractivos porque las células endoteliales vasculares que están implicadas en la angiogénesis tumoral no mutan con tanta facilidad como las células cancerosas; por consiguiente, las células endoteliales vasculares tienen una menor probabilidad, comparadas con las células cancerosas, de adquirir resistencia a una terapia prolongada, lo cual les hace ser dianas terapéuticas útiles.

- 5 Existen varios conjuntos de pruebas que sugieren que S1P es un factor del crecimiento proangiogénico potencialmente significativo que puede ser importante en la angiogénesis tumoral, que incluyen lo siguiente: los anticuerpos anti-S1P pueden neutralizar la formación de tubos inducida por S1P, la migración de células endoteliales vasculares y la protección frente a la muerte celular en diversos ensayos *in vitro* que emplean HUVEC; la inyección de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama que expresan niveles elevados de S1P en almohadillas de grasa mamaria de ratones atímicos produce un aumento en los tumores dependientes de la angiogénesis, que son más grandes y numerosos que cuando se emplean células control; los anticuerpos anti-S1P pueden reducir notablemente la angiogénesis asociada a tumores en un modelo de aloinjerto de melanoma murino ortotópico; la S1P aumenta el crecimiento capilar nuevo hacia lechos cortos de Matrigel implantados en ratones, un efecto que puede ser neutralizado mediante la administración sistémica de anticuerpos anti-S1P; la administración *in vivo* de anticuerpos anti-S1P puede neutralizar completamente la angiogénesis inducida por factores del crecimiento proangiogénicos (por ejemplo, por bFGF y VEGF) en ensayos de lechos cortos de Matrigel murinos; la S1P estimula la liberación de bFGF y VEGF desde células tumorales *in vitro* e *in vivo*, un efecto que puede ser revertido por anticuerpos anti-S1P; la S1P potencia la movilidad y la invasión *in vitro* de un gran número de diferentes tipos de células cancerosas, que incluyen células multiformes de glioblastoma; y los anticuerpos anti-S1P reducen significativamente la neovascularización asociada con modelos animales de AMD.

La importancia de S1P en los tumores dependientes de la angiogénesis hace que S1P sea una diana excelente para el tratamiento del cáncer. En efecto, la neutralización por anticuerpos de la S1P extracelular puede dar como resultado una notable disminución en el avance del cáncer en mamíferos, incluyendo seres humanos, como resultado de la inhibición de la formación de vasos sanguíneos con la pérdida concomitante de los nutrientes y el oxígeno necesarios para apoyar el crecimiento tumoral. Así, los anticuerpos anti-S1P tienen varios mecanismos de acción, que incluyen: (1) efectos directos sobre el crecimiento de células tumorales; (2) efectos antiangiogénicos indirectos sobre las células endoteliales vasculares; y (3) los efectos antiangiogénicos indirectos que evitan la liberación y la acción de otros factores del crecimiento proangiogénicos. Por consiguiente, los anticuerpos anti-S1P también pueden actuar como compuestos terapéuticos antimetastásicos, además de proporcionar una terapia antiangiogénica.

El control de la angiogénesis es un componente crítico para el tratamiento de otras enfermedades dependientes de la angiogénesis además del cáncer, tales como la degeneración macular relacionada con el envejecimiento, la retinopatía de prematuridad, la retinopatía diabética, la endometriosis y la artritis reumatoide (Carmeliet, P. (2005), Nature, vol. 438(15):932-6).

- 35 Los compuestos terapéuticos antiangiogénicos también son particularmente atractivos porque las células endoteliales vasculares que están implicadas en la angiogénesis tumoral no mutan con tanta facilidad como las células cancerosas; por consiguiente, es menos probable que las células endoteliales vasculares, comparadas con las células cancerosas, adquieran resistencia a una terapia prolongada, lo cual les hace ser dianas terapéuticas útiles. Los anticuerpos S1P y sus derivados también serán útiles para tratar otros trastornos hiperproliferativos asociados con la actividad S1P, tales como los provocados por la proliferación aberrante de células endoteliales que aparece con la angiogénesis asociada con AMD.

iii. Fibrogénesis y cicatrización

(a) S1P, fibroblastos y el proceso de remodelación

45 Resulta evidente que los fibroblastos cardíacos, en particular los miofibroblastos, son elementos celulares clave en la formación de cicatrices en respuesta a la muerte celular y la inflamación en un infarto de miocardio (MI). La expresión de genes de colágeno de miofibroblastos es una característica de la remodelación y es necesaria para la formación de cicatrices. Además de sus otras actividades, la S1P también es un mediador inflamatorio que contribuye en gran medida a la curación de heridas mediante la activación de la migración y la proliferación de fibroblastos, además de la activación de plaquetas, la estimulación de la angiogénesis y la estimulación de la función del músculo liso. Así, S1P, quizás producida de forma local por el miocardio lesionado, puede ser responsable, en parte, de la curación de heridas desadaptativa asociada con la remodelación y la insuficiencia cardíaca, en particular mediante la activación de miofibroblastos en el corazón.

Existen tres respuestas generales de las células a S1P: la protección frente a la muerte celular; la estimulación de la proliferación; y la estimulación de las respuestas migratorias. Por consiguiente, la actividad de S1P o su implicación en una enfermedad, línea celular, etc. concretas puede evaluarse adaptando los ensayos de este tipo para este fin. Existen pruebas de que los fibroblastos responden a S1P en estas tres formas para estimular la curación de heridas. Por ejemplo, en varios de los ejemplos de la sección de ejemplos que aparece a continuación, se presentan pruebas que demuestran que S1P contribuye a la remodelación mediante la estimulación de la actividad de los miofibroblastos cardíacos (proliferación, migración y expresión de genes de colágeno).

Los anticuerpos anti-S1P o los derivados de anticuerpos también evitan el exceso de cicatrización asociado con procedimientos quirúrgicos. El exceso de cicatrización después de una lesión o una cirugía, un problema en adultos pero no en tejido dérmico fetal (Adzick y Lorenz (1994), *Ann. Surg.*, vol. 220:10-18) se atribuye a un exceso de TGF- β en el tejido dérmico adulto después de una lesión. La S1P se ha implicado como activador potente del sistema de señalización del TGF- β . Por consiguiente, se podría esperar que un anticuerpo anti-S1P limite el exceso de cicatrización después de una lesión o cirugía.

(b) Protección frente a la muerte celular por LAP y S1P

El LPA es un agente que protege a las células cancerosas frente a la apoptosis. Así, tal como se analizó en detalle anteriormente, un anticuerpo contra LPA, por ejemplo, hará que las células cancerosas sean más susceptibles a la quimioterapia. De hecho, esto ha sido demostrado en los ejemplos que aparecen a continuación en la presente, empleando los recién desarrollados anticuerpos monoclonales anti-LPA.

Como es el caso para muchos tipos celulares, los fibroblastos se protegen directamente frente a la apoptosis mediante la adición de S1P y la apoptosis es potenciada por inhibidores de SPHK y S1P bloquea la liberación de citocromo C y la activación de caspasa resultante. Además, los fibroblastos transfectados con SPHK1 muestran protección frente a la apoptosis, un efecto que puede depender de la translocación de SPHK1 hacia la membrana plasmática. Se sabe que SPHK1 sobreexpone a Akt, regulando con ello a los miembros de la familia de Bcl-2 y protegiéndolos frente a la apoptosis. Además, la S1P₃ es necesaria para la fosforilación de Akt en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Además, la sobreexpresión de SPHK y los aumentos resultantes en los niveles de S1P protegen a los cardiofibroblastos frente a la apoptosis.

La ceramida, un metabolito corriente arriba de la S1P, disminuye el potencial de membrana mitocondrial que coincide con un aumento de la transcripción de proteínas mitocondriales que inducen la muerte. Debido al mecanismo reostático, la S1P puede tener el efecto opuesto y proteger a los miofibroblastos cardíacos (es decir, los fibroblastos totalmente diferenciados en el corazón) frente a la apoptosis. En efecto, la S1P incluso puede activar la autofagia como mecanismo de protección. Estos efectos pueden ser revertidos por los anticuerpos anti-S1P neutralizantes (u otras moléculas que se unan y actúen para secuestrar a la S1P).

B. Dolor

Se cree que los lípidos bioactivos desempeñan papeles importantes en la patogénesis del dolor, incluyendo el dolor neuropático y el dolor asociado a la quimioterapia.

El papel significativo de la señalización de LPA en el desarrollo del dolor neuropático ha sido establecido utilizando diversas estrategias farmacológicas y genéticas, que incluyen el uso de ratones que carecen del receptor LPA1 (véase, por ejemplo, Ueda, *et al.* (2006), *Pharmacol. Ther.*, vol. 109:57-77; Inoue, *et al.* (2004), *Nat. Med.*, vol. 10:712-8). Los animales de tipo salvaje con lesiones nerviosas desarrollan hiperalgesia y alodinia conductual parejas a una desmielinación en la raíz dorsal y un aumento en la expresión de la isoforma C de la proteína quinasa dentro del cuerno dorsal de la médula espinal y de la subunidad del canal de calcio 21 en los ganglios de la raíz dorsal. Una inyección intratecal de LPA induce cambios conductuales, morfológicos y bioquímicos similares a los observados después de la ligadura nerviosa. Por contraste, los ratones que carecen de un único receptor de LPA (LPA-1, también conocido como EDG-2) que activa la vía de Rho-Rho quinasa, no desarrollan señales de dolor neuropáticos después de una lesión en nervios periféricos. Los inhibidores de Rho y Rho quinasa también evitan que aparezcan estas señales de dolor neuropático. Estos resultados implican que la señalización de LPA mediada por receptores es fundamental para que aparezca el dolor neuropático y que un anticuerpo contra LPA probablemente aliviaría el dolor neuropático en individuos que padecen este trastorno (Moulin, D.E. (2006), *Pain Res. Manag.*, vol. 11, supl. A: 30A-6A).

En el contexto de otro tipo de dolor, el dolor asociado con quimioterapia es la principal toxicidad limitante de la dosis de muchos agentes quimioterapéuticos de molécula pequeña. En efecto, se han indicado muchas clases de dolor inducido por quimioterapia. Por ejemplo, el paclitaxel (taxol), un agente antineoplásico derivado del tejo del Pacífico *Taxus brevifolia*, se emplea para tratar una diversidad de cánceres, incluyendo cáncer de ovario, de mama y de pulmón no microcítico. Sin embargo, la eficacia del paclitaxel está limitada por el desarrollo altamente incidental de graves neuropatías periféricas dolorosas, tales como entumecimiento y dolor quemante. Se podría administrar un anticuerpo monoclonal contra un lípido bioactivo que se correlacione con este dolor, por ejemplo, LPA (o un derivado de dicho anticuerpo que contenga una porción de unión al lípido de este) en combinación con paclitaxel para reducir el dolor asociado con el agente quimioterapéutico. Como resultado de mejorar esta toxicidad limitante de la dosis, la cantidad de paclitaxel que se va a administrar podría ser incluso mayor (y así incluso más eficaz) cuando se emplea en combinación con dicho anticuerpo monoclonal o derivado de anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico (u otro fármaco) puede conjugarse o asociarse de otra forma con el anticuerpo o el derivado de anticuerpo, por ejemplo, mediante la unión covalente del agente quimioterapéutico de molécula pequeña con el anticuerpo, mediante la unión del agente quimioterapéutico de molécula pequeña a un andamiaje multivalente al cual también está unido un anticuerpo monoclonal o al menos un dominio de unión al lípido bioactivo derivado de un anticuerpo monoclonal específicamente reactivo contra el lípido bioactivo diana, etc.

C. Enfermedades y trastornos cardiovasculares

La enfermedad cardíaca isquémica es la principal causa de muerte en EEUU. Cada año, aproximadamente 1,5 millones de personas sufren ataques al corazón (infarto de miocardio), de los cuales aproximadamente una tercera parte (es decir, aproximadamente 500.000) son mortales. Además, aproximadamente 6,75 millones de estadounidenses sufren de angina de pecho, la manifestación más común de isquemia cardíaca. En total, existen más de 13 millones de pacientes que viven con la enfermedad cardíaca isquémica sólo en EEUU. La "isquemia" es un trastorno asociado con un flujo inadecuado de sangre oxigenada a una parte del cuerpo, generalmente provocado por la constricción o el bloqueo de los vasos sanguíneos que la suministran. La isquemia aparece cuando el flujo sanguíneo a un tejido se reduce por debajo de un nivel crítico. Esta reducción en el flujo sanguíneo puede ser el resultado de: (i) el bloqueo de un vaso por un émbolo (coágulo sanguíneo); (ii) el bloqueo de un vaso debido a aterosclerosis; (iii) la rotura de un vaso sanguíneo (un ictus hemorrágico); (iv) el bloqueo de un vaso sanguíneo debido a una vasoconstricción aguda; (v) un infarto de miocardio (cuando el corazón se detiene, el flujo de sangre a los órganos se reduce y se produce la isquemia); (vi) traumatismos; (vii) cirugía, durante la cual el flujo sanguíneo a un tejido u órgano debe reducirse o detenerse para lograr los objetivos de la cirugía (por ejemplo, angioplastia, trasplantes de corazón y pulmón/corazón); (viii) la exposición a ciertos agentes, por ejemplo, dobutamina o adenosina (Lagerqvist, *et al.* (1992), *Br. Heart J.*, vol. 68:282-285); o (ix) agentes antineoplásicos u otros agentes quimioterapéuticos, tales como doxorubicina, que son cardiotoxicos.

Aunque el caudal (volumen/tiempo) de la sangre sea adecuado, la isquemia aun así puede producirse debido a una hipoxia, es decir, una condición en la que el contenido en oxígeno de la sangre es insuficiente para satisfacer las necesidades normales de oxígeno celulares del área o áreas afectadas. La sangre hipóxica, por definición, es distinta de la sangre normóxica, es decir, la sangre en la que el contenido en oxígeno es suficiente para satisfacer las necesidades celulares de oxígeno normales. Las condiciones hipóxicas pueden ser el resultado, aunque no se limitan a formas de insuficiencia cardíaca que afectan de forma adversa al bombeo cardíaco, tales como hipertensión, arritmias, choque séptico, traumatismo, cardiomiopatías y enfermedad cardíaca congestiva.

Los trastornos isquémicos del miocardio aparecen cuando el flujo sanguíneo cardíaco está restringido (isquemia) y/o cuando el suministro de oxígeno al músculo cardíaco está comprometido (hipoxia), de modo que la demanda de oxígeno del corazón no es satisfecha por el suministro. La enfermedad de la arteria coronaria (CAD), que surge de la arteriosclerosis, en particular la aterosclerosis, es la causa más habitual de isquemia y tiene síntomas tales como angina de pecho estable o inestable. La CAD puede conducir a infartos agudos de miocardio (AMI) y muerte cardíaca súbita. El espectro de condiciones isquémicas que producen una insuficiencia cardíaca se denomina síndrome coronario agudo (ACS). Una lesión por reperfusión es a menudo una consecuencia de la isquemia, en particular cuando se emplean anticoagulantes, agentes trombolíticos, o medicaciones anti-angina, o cuando la vasculatura cardíaca se abre quirúrgicamente por angioplastias o por injertos de arteria coronaria.

En la actualidad, los tratamientos del infarto agudo de miocardio y otras enfermedades cardíacas incluyen, pero no se limitan a dispositivos mecánicos y procedimientos asociados con ellos, por ejemplo, angioplastia coronaria, agentes trombolíticos, tales como estreptoquinasa, tPA y sus derivados. Los adyuvantes para estas terapias incluyen beta-bloqueantes, aspirina y heparina, e inhibidores de glicoproteína (GP) IIb/IIIa. Los inhibidores de GP IIb/IIIa disminuyen la agregación de plaquetas y la formación de trombos. Los ejemplos incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo abciximab), péptidos cíclicos (por ejemplo, eptifibatida) y peptidomiméticos no peptídicos (por ejemplo, tirofiban, lamifibano, xemilofibano, sifrafibano y lefradafibano).

Los tratamientos preventivos incluyen los tratamientos que reducen los niveles de colesterol de un paciente, por ejemplo, mediante la gestión de la dieta y la intervención farmacológica. Las estatinas son un tipo de agente que se emplea para reducir los niveles de colesterol. Se cree que las estatinas actúan inhibiendo la actividad de la HMG-CoA reductasa, que a su vez aumenta la producción hepática de receptores de colesterol. Los receptores de colesterol hepáticos se unen al colesterol y lo retiran de la sangre. Estos agentes incluyen lovastatina, simvastatina, pravastatina y fluvastatina. Estas y otras estatinas frenan el avance de la enfermedad de la arteria coronaria y pueden inducir la regresión de lesiones ateroscleróticas en pacientes, aunque la gama de efectos secundarios como consecuencia del uso de dichos fármacos no se entiende totalmente.

Tal como se apreciará, pueden utilizarse anticuerpos monoclonales y derivados y otros fragmentos y variantes reactivos contra un lípido bioactivo, para realizar una terapia cardíaca, solos o en combinación con otras estrategias terapéuticas, que incluyen un tratamiento con fármacos y/o cirugía. En este caso, la "terapia cardíaca" se refiere a la prevención y/o el tratamiento de enfermedades, trastornos o traumatismos físicos miocárdicos, que incluyen isquemia miocárdica, AMI, CAD y ACS, así como traumatismos o daños en células y tejidos cardíacos que pueden aparecer durante o como consecuencia de una cardiología de intervención u otras terapias o procedimientos quirúrgicos o médicos que pueden provocar daños isquémicos o isquémicos/por reperfusión en mamíferos, en particular seres humanos.

Además del corazón y del cerebro, también puede aplicarse una estrategia anti-S1P a otros trastornos similares al ictus de base vascular, tales como diversas patologías del oído interno (Scherer, *et al.* (2006), *Cardiovascular Research*, vol. 70:79-87).

D. Enfermedades y trastornos cerebrovasculares

Los pacientes que sufren isquemia cerebral a menudo padecen discapacidades que varían de un déficit neurológico transitorio a daños irreversibles (ictus) o muerte. La isquemia cerebral, es decir, la reducción o cese del flujo sanguíneo hacia el sistema nervioso central, puede clasificarse como focal o global. La isquemia cerebral focal se refiere al cese o a la reducción del flujo sanguíneo dentro de la vasculatura cerebral que resulta de una oclusión parcial o completa de las arterias cerebrales intracraneales o extracraneales. Esta oclusión generalmente produce un ictus, un síndrome caracterizado por la aparición aguda de un déficit neurológico que persiste durante al menos 24 horas, que refleja la implicación focal del sistema nervioso central y es el resultado de una alteración de la circulación cerebral. Otras causas de la isquemia cerebral focal incluyen vasoespasmos debidos a una hemorragia subaracnoide o una intervención iatrogénica.

La isquemia cerebral global se refiere a la reducción del flujo sanguíneo dentro de la vasculatura cerebral que resulta de una insuficiencia circulatoria sistémica, que rápidamente conduce a una reducción en el transporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos. Así, la isquemia cerebral global resulta de una disminución grave de la actuación cardíaca y con mucha frecuencia es provocada por un AMI, aunque otras causas incluyen insuficiencia de bombeo que resulta de una miocarditis aguda o una disminución de la contractilidad miocárdica tras una parada cardíaca o un bypass cardiopulmonar prolongado; anomalías mecánicas, tales como estenosis valvular grave, regurgitación aórtica o mitral masiva y defectos septales ventriculares agudamente adquiridos; así como de arritmia cardíaca, tal como fibrilación ventricular, o de procedimientos intervencionistas, tales como angioplastia de carótida, colocación de stents, endarterectomía, cateterización cardíaca, estudios electrofisiológicos y angioplastia.

Las lesiones isquémicas después de un ictus y/o MI generalmente conducen a la muerte celular por despolarización de células críticas con un aumento resultante en Na^+ y Ca^{++} intracelular, seguido de muerte celular. Un canal para controlar este proceso es la proteína del receptor de potencial transitorio, un canal no dependiente del voltaje; recientemente, se ha identificado a la S1P como activador de este canal a través de un mecanismo dependiente de GPCR. Además, la proteína del receptor de potencial transitorio, la esfingosina quinasa 1 y la esfingocinasa 2 comparten regiones de promotores con Egr-1, un importante interruptor general que se cree que regula la patobiología cardiovascular (Khachigian, L.M. (2006), *Circ. Res.*, vol. 98:186-191) y Sp1, un factor de la transcripción que desempeña un papel fundamental en la muerte de las células neurales (Simard, *et al.* (2006), *Nat. Med.*, vol. 12:433-40). Basándose en estos descubrimientos, se esperaría que un anticuerpo contra S1P mitigue la muerte celular provocada por una isquemia tras hipoxia.

Los expertos en la técnica pueden identificar con facilidad a los pacientes que tienen ictus o que están en riesgo de padecer un ictus, isquemia cerebral, traumatismo cefálico, o epilepsia. Por ejemplo, los pacientes que están en riesgo de padecer un ictus incluyen los que tienen hipertensión o se van a someter a cirugía mayor. Tradicionalmente, la gestión emergente del ictus isquémico agudo ha consistido principalmente en cuidados de apoyo generales, por ejemplo, hidratación, control del estado neurológico, control de la presión sanguínea y/o terapia anti-plaquetas o anti-coagulación. Se ha administrado heparina a pacientes con ictus con una eficacia limitada y no constante. En algunas circunstancias, la isquemia se resuelve a lo largo de un periodo de tiempo debido al hecho de que algunos trombos se absorben hacia la circulación, o se fragmentan y viajan a puntos distales a lo largo de un periodo de unos pocos días. El activador de plasminógeno tisular (t-PA) ha sido aprobado para tratar el ictus agudo, aunque este tratamiento sistémico ha sido asociado con un aumento del riesgo de hemorragia intracerebral y otras complicaciones hemorrágicas. Aparte de la administración de agentes trombolíticos y heparina, en la actualidad no existen opciones terapéuticas en el mercado para los pacientes que padecen una isquemia cerebral focal de oclusión. Los vasoespasmos pueden responder parcialmente a los agentes vasodilatadores. El reciente campo en desarrollo de la cirugía neurovascular, que implica colocar dispositivos mínimamente invasivos dentro de las arterias carótidas para eliminar físicamente la lesión ofensiva, puede proporcionar una opción terapéutica para estos pacientes en el futuro, aunque este tipo de manipulación puede conducir al propio vasoespasmo.

Tal como se apreciará, pueden utilizarse anticuerpos, derivados de anticuerpos y otros restos inmunoderivados reactivos contra un lípido bioactivo para realizar una terapia cerebrovascular, por sí solos o en combinación con otras estrategias terapéuticas, que incluyen un tratamiento con fármacos y/o cirugía. En este caso, la "terapia cerebrovascular" se refiere a la terapia dirigida a la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la isquemia cerebral y/o la hipoxia. De interés particular resulta la isquemia cerebral y/o la hipoxia que surgen de una isquemia global que se reanuda después de una enfermedad cardíaca, así como traumatismos o terapias o procedimientos quirúrgicos o médicos que pueden provocar daños cerebrovasculares isquémicos o isquémicos/por perfusión en mamíferos, en particular seres humanos.

E. Aplicaciones de diagnóstico y terapéutico para los anticuerpos que se unen a lípidos bioactivos

Puesto que se ha aclarado el papel de diversos lípidos bioactivos en enfermedades, pueden imaginarse nuevos usos para los anticuerpos que se unen a lípidos bioactivos en el diagnóstico y el terapéutico. Según la presente descripción, se proporcionan métodos para potenciar la detección de lípidos bioactivos utilizando lípidos derivatizados unidos a un soporte sólido. Además del uso de estos métodos de detección para la producción y la caracterización de anticuerpos y en investigación, la detección potenciada de lípidos bioactivos también puede

proporcionar una estrategia de diagnóstico valiosa para enfermedades asociadas con lípidos bioactivos. Cuando se combina con otras técnicas, se proporciona una estrategia terapéutica para diseñar un tratamiento óptimo para el paciente. Un ejemplo no limitante es el uso de anticuerpos anti-S1P para métodos de diagnóstico y terapéutico relacionados con el papel de S1P como biomarcador para el cáncer. También se contemplan métodos de diagnóstico y terapéutico que emplean anticuerpos dirigidos a LPA u otros lípidos bioactivos y para otras indicaciones de enfermedad.

Recientemente, la bibliografía científica ha sugerido que la S1P es un potente factor del crecimiento tumorigénico que probablemente es liberado por las células tumorales y que la S1P puede ser un nuevo biomarcador para la detección del cáncer en una etapa temprana. SPHK, la enzima que es responsable para la producción de S1P, está significativamente sobreexpresada en una diversidad de tipos de cáncer (French, Schrecengost *et al.* (2003)). La actividad SPHK está sobreexpresada en 2-3 veces en cáncer maligno de mama, colon, pulmón, ovario, estómago, útero, riñón y recto, cuando se compara con tejido normal adyacente. Estos investigadores también han demostrado que la expresión de SPHK varía de un paciente a otro, lo cual sugiere que los tumores de algunos pacientes pueden ser más dependientes de S1P que los de otros pacientes con el mismo tipo de tumor. Una búsqueda en las bases de datos genómicas disponibles en el mercado (ASSENTA, Genelogic Inc., Gaithersburg, MD) confirma que la expresión relativa de SPHK, en general, es significativamente alta en una amplia variedad de tumores malignos.

Recientes publicaciones también han sugerido que S1P puede ser un nuevo biomarcador para el cáncer (Xu y. *et al.* (1998), JAMA, 280:719-723; Shen, Z. *et al.* (2001), Gynecol. Oncol., 83:25-30; Xiao y.J. *et al.* (2001), Anal. Biochem., 290(2): 302-313; Sutphen (2004), Cancer Epidemiology, 13(7) 1185-1191). Por ejemplo, Sutphen *et al.* han demostrado que los niveles séricos de S1P son altos en pacientes con cáncer de ovario en una etapa temprana (Sutphen, 2004). A partir de los datos, se podría predecir que los pacientes con cáncer de mama también podrían mostrar alguna variabilidad en su dependencia de S1P. Tomadas conjuntamente, estas observaciones preliminares sugieren que podría predecirse el éxito de un compuesto terapéutico anti-S1P, por ejemplo, un compuesto terapéutico de mAb anti-S1P, para un paciente individual si una biopsia de tejido, sangre, orina u otra muestra de tejido o fluido del paciente muestra unos niveles altos de S1P.

Se ha descrito el uso potencial de S1P en fluidos biológicos en las siguientes patentes, todas las cuales están cedidas junto con la presente solicitud: US 6.534.323; US 6.534.322; US 6.210.976; US 6.858.383; US 6.881.546; US 7.169.390; y US 6.500.633.

Aunque los anticuerpos humanizados tiene baja toxicidad y grandes índices terapéuticos, son muy costosos para el paciente y para los cuidadores sanitarios. Así, dirigir la utilidad del compuesto terapéutico de mAb anti-S1P a aquellos que responderían con más probabilidad a este tratamiento disminuiría los riesgos y minimizaría el coste, a la vez que proporcionaría un beneficio óptimo para el paciente.

A continuación se esbozan unas cuantas aplicaciones propuestas de diagnóstico y terapéutico de biolípidos para una mejor gestión de enfermedades.

1. La S1P puede utilizarse como biomarcador para predecir la eficacia terapéutica para pacientes individuales en especial cuando se combina con la genómica basada en esfingolípidos. Basándose en descubrimientos recientes, los inventores puede predecir que los tumores dependientes de S1P pueden producir su propia S1P además de la abundante fuente sérica de S1P. Los tumores muy agresivos utilizan la estrategia de producir sus propios factores del crecimiento y los inventores sugieren que S1P es uno de los factores del crecimiento. Por tanto, las mediciones en suero, plasma u orina de la S1P total de pacientes individuales sería una predicción del resultado final del paciente. Además, la producción de S1P se concentraría en el propio tumor y en el microentorno del tumor (por ejemplo, el fluido intersticial). El ejemplo 11 que aparece a continuación describe el uso de un mAb anti-S1P en un método inmunohistoquímico de una sección de tumor para evaluar la producción de S1P por el propio tumor. La sobreexpresión de SPHK puede demostrar ser útil, pero puesto que la quinasa es una enzima, se cree que la señal, según se mide mediante la producción de S1P, sería mucho mayor que si estuviera basada en el ARN o la expresión proteica de la propia quinasa. Además, se presenta la hipótesis de que los pacientes cuyos tumores presentan una sobreexpresión de los receptores de S1P y la expresión de SPHK presentan mayor probabilidad de que tengan tumores que dependen de S1P como factor del crecimiento. Se cree que estos pacientes serían los más beneficiados por la terapia de mAb anti-S1P putativa de los inventores. Por tanto, unos bioensayos con tejido de biopsia analizado mediante PCR cuantitativa para la expresión relativa de los receptores de S1P y SPHK proporcionarían una potente plataforma de terapéutico. Esta plataforma de terapéutico consistiría en un análisis del marcador S1P sérico en combinación con la cuantificación genómica o proteómica de marcadores proteicos relacionados con S1P como marcadores sustitutos de enfermedad. Este nuevo análisis de múltiples marcadores proporcionaría una plataforma muy potente para la predicción de la respuesta individual a una terapia basada en mAb anti-S1P (SPHINGOMAB™).

2. La S1P puede utilizarse como marcador sustituto para titular un régimen terapéutico. La concentración de S1P sérica de los pacientes que se están tratando con el mAb anti-S1P tiene el potencial de ser utilizada como marcador sustituto para evaluar el desarrollo del tratamiento. Una plataforma basada en ELISA que emplee muestras de suero, plasma u orina del paciente permitiría la medición precisa de los niveles de biomarcadores de S1P para determinar con más precisión el régimen de dosificación de mAb anti-S1P para cada individuo. Los niveles de los

marcadores sustitutos podrían utilizarse en combinación con criterios de valoración clínicos convencionales para determinar la eficacia del régimen médico.

3. La S1P puede utilizarse como herramienta de selección para la detección temprana del cáncer. La detección temprana del cáncer es un problema debido a la fuerte correspondencia entre la etapa del avance y el éxito de la terapia. El cáncer de ovario de etapa I es muy difícil de detectar debido al hecho de que la mayoría de las pacientes son asintomáticas. Para cuando se diagnostica el cáncer de ovario, la mayoría de las pacientes están en las etapas tardías de la enfermedad. La detección a una etapa más temprana presenta beneficios obvios para el resultado final del paciente. Tal como se describió anteriormente, el suero de las pacientes con cáncer de ovario contiene un aumento en 2 veces en S1P y este aumento puede detectarse con facilidad con la presente plataforma de ELISA. Puesto que muchos tipos de tumores sólidos, incluyendo el cáncer de ovario, muestran una alta expresión de SPHK, se supone que muchos de los pacientes con estos cánceres mostrarán un alto contenido en S1P en la sangre y/u orina que permitirían al médico intervenir en una fase más temprana del avance de la enfermedad.

Los lípidos bioactivos derivatizados descritos en la presente también pueden utilizarse para detectar el nivel de anticuerpos en una muestra de fluido o tejido de un paciente. Aunque no se pretenda limitación alguna por lo expuesto a continuación, estos inmunoensayos detectan la presencia de anticuerpos antiesfingolípidos en la sangre y pueden utilizarse para ensayar indirectamente el aumento en esfingolípidos en pacientes con trastornos isquémicos crónicos, cáncer o trastornos autoinmunitarios, tales como la esclerosis múltiple. Este ensayo se basa en la suposición de que los pacientes producen anticuerpos antiesfingolípidos como consecuencia de unos niveles en sangre elevados de esfingolípidos por analogía con los anticuerpos antilactosilesfingosina observados en pacientes con cáncer colorrectal (Jozwiak W. y J. Koscielak, Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 18:617-621, 1982) y los anticuerpos antigalactocerebrósido detectados en el suero de pacientes con lepra (Vemuri N. *et al.*, Leprosy Rev., 67:95-103, 1996).

F. Investigación

Las dianas de lípidos de señalización bioactivos descritas en la presente pueden adaptarse con facilidad para su uso en ensayos de selección de alta capacidad de procesamiento para seleccionar compuestos candidatos para identificar a los que tienen una actividad deseada, por ejemplo, inhibir una enzima que cataliza la reacción que produce un lípido de señalización bioactivo no deseado, o bloquear la unión de un lípido de señalización bioactivo a un receptor para este. Los compuestos así identificados pueden actuar como "compuestos guía" convencionales o en sí mismos pueden utilizarse como agentes terapéuticos. Los métodos de selección de la invención comprenden la utilización de ensayos de selección para identificar, a partir de un banco de moléculas diversas, uno o más compuestos que tengan la actividad deseada. Un "ensayo de selección" es un ensayo selectivo diseñado para identificar, aislar y/o determinar la estructura de compuestos dentro de una colección que tienen una actividad preseleccionada. La colección puede ser un banco combinatorio tradicional que se prepara según métodos conocidos en la técnica, o puede ser adquirida en el mercado y tener una amplia gama de estructuras orgánicas o estructuras preseleccionadas para una actividad de señalización bioactiva potencial. "Identificar" significa que se aísla un compuesto que tiene una actividad deseada, se determina su estructura química (que incluye, sin limitación, determinar las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los ácidos nucleicos y los polipéptidos, respectivamente) y además, o como alternativa, se purifican los compuestos que tienen la actividad seleccionada. Se diseñan ensayos bioquímicos y biológicos para ensayar la actividad en una amplia gama de sistemas que varían de interacciones de proteína-proteína, catálisis enzimática, unión de proteínas-moléculas pequeñas, hasta funciones celulares. Estos ensayos incluyen ensayos automáticos, semiautomáticos y ensayos de selección de alta capacidad de procesamiento.

Ejemplos

La invención se describirá a continuación haciendo referencia a los siguientes ejemplos detallados. No debe considerarse de ninguna manera que estos ejemplos limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Esquema sintético para preparar un análogo tiolado de S1P representativo

La estrategia sintética descrita en este ejemplo da como resultado la preparación de un antígeno mediante la adición en serie de elementos estructurales utilizando principalmente la química orgánica convencional. Un esquema para la estrategia descrita en este ejemplo se proporciona en la figura 1 y los números de los compuestos en la siguiente descripción sintética se refieren a las estructuras numeradas en la figura 1.

Esta estrategia sintética comienza con el 15-hidroxipentadecino disponible en el mercado, **1** y la activación por cloruro de metilsulfonilo del grupo 15-hidroxi para lograr la sustitución del hidroxilo para producir el sulfonato, **2**. La sustitución del sulfonato con *t*-butiltiol produce el tioéter protegido, **3**, que se condensa con aldehído de Garner para producir **4**. Una reducción suave del resto alquino para producir un alqueno (**5**), seguido de una apertura catalizada con ácido del anillo de oxazolideno produce esfingosina sustituida con tiol *S*-protegida y *N*-protegida, **6**. Durante esta última etapa, se emplea una rederivatización con dicarbonato de di-*t*-butilo para mitigar la pérdida del grupo *N*-BOC durante la apertura del anillo catalizada por ácido.

Tal como se apreciará, el propio compuesto **6** puede utilizarse como antígeno para preparar los haptenos para

generar anticuerpos contra la esfingosina o, como alternativa, como material de partida para dos estrategias sintéticas diferentes para preparar un análogo de S1P tiolado. En una estrategia, la fosforilación del compuesto **6** con trimetilfosfato produce el compuesto **7**. El tratamiento del compuesto **7** con bromuro de trimetilsililo elimina ambos grupos metilo del fosfato y el grupo *t*-butiloxycarbonilo de la amina primaria, dejando el compuesto **8** con el grupo *t*-butilo sobre el azufre como único grupo protector. Para retirar este grupo, el grupo *t*-butilo es desplazado por NBS para formar el disulfuro **9**, que entonces se reduce para formar el análogo de S1P tiolado, **10**.

Otra estrategia implica tratar el compuesto **6** directamente con NBSC1 para formar el disulfuro, **11**, que entonces se reduce para formar el análogo de S1P tiolado *N*-protegido, **12**. El tratamiento de este compuesto con un ácido suave produce el análogo de esfingosina tiolado, **13**, que puede fosforilarse de modo enzimático, por ejemplo con esfingosina quinasa, para producir el análogo de S1P tiolado, **10**.

Son posibles modificaciones de la estrategia sintética presentada, en particular con respecto a la selección de reactivos protectores y desprotectores, por ejemplo, el uso de triflato de disulfuro de trimetilo descrito en el ejemplo 3 para desproteger el tiol.

Compuesto 2: Se añadió DCM (400 mL) a un matraz RB de 500 mL cargado con **1** (10,3 g, 45,89 mmol) y la disolución resultante se enfrió hasta 0 °C. Después se añadió TEA (8,34 g, 82,60 mmol, 9,5 mL) en una porción, seguido de MsCl (7,88 g, 68,84 mmol, 5,3 mL) añadido gota a gota a lo largo de 10 min. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 0,5 h o hasta la desaparición del material de partida ($R_f = 0,65$, hexanos:EtOAc 5:1). La reacción se extinguió con NH_4Cl (300 mL) y se extrajo (2 x 200 mL) con DCM. Las capas orgánicas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el filtrado se evaporó para producir un sólido (13,86 g, rendimiento del 99,8%).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ 4,20 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,98 (s, 3H), 2,59 (td, $J = 7$ Hz, 3 Hz, 2H), 1,917 (t, $J = 3$ Hz, 1H), 1,72 (quintete, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,505 (quintete, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,37 (s a, 4H), 1,27 (s a, 14H); RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3) δ 85,45, 70,90, 68,72, 46,69, 38,04, 30,22, 30,15, 30,14, 30,07, 29,81, 29,76, 29,69, 29,42, 29,17, 26,09, 19,06, 9,31. El ion principal observado en un análisis de HRMS (ES-TOF) del compuesto **2** fue $m/z = 325,1804$ (calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{S}$: $\text{M}+\text{Na}^+$ 325,1808).

Compuesto 3. Un matraz RB de 1 l con tres bocas se cargó con *t*-butiltiol (4,54 g, 50,40 mmol) y THF (200 mL) y después se colocó en un baño de hielo. Se añadió *n*-BuLi (31,5 mL de 1,6 M en hexanos) a lo largo de 30 min. Después se añadió el compuesto **2** (13,86 g, 45,82 mmol), disuelto en THF (100 mL), a lo largo de 2 min. La reacción se dejó en agitación durante 1 hora o hasta la desaparición del material de partida ($R_f = 0,7$, hexanos:EtOAc 1:1). La reacción se extinguió con NH_4Cl saturado (500 mL) y se extrajo con Et_2O (2 x 250 mL), se secó MgSO_4 , se filtró y se evaporó para producir un aceite amarillo (11,67 g, rendimiento del 86%).

RMN de ^1H (CDCl_3) δ 2,52 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,18 (td, $J = 7$ Hz, 2,5 Hz, 2H), 1,93 (t, $J = 2,5$ Hz, 1H), 1,55 (quintete, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,51 (quintete, $J = 7$ Hz, 2H), 1,38 (s a, 4H), 1,33 (s, 9H), 1,26 (s, 14H), RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3) δ 85,42, 68,71, 68,67, 54,07, 42,37, 31,68, 30,58, 30,28, 30,26, 30,19, 30,17, 29,98, 29,78, 29,44, 29,19, 29,02, 19,08.

Compuesto 4. Un matraz de Schlenk de 250 mL cargado con el compuesto **3** (5,0 g, 16,85 mmol) se sometió a vacío y se llenó con nitrógeno tres veces antes de añadir THF seco (150 mL). La disolución resultante se enfrió hasta -78 °C. Después se añadió *n*-BuLi (10,5 mL de 1,6 M en hexanos) a lo largo de 2 min y la mezcla de reacción se agitó durante 18 min a -78 °C antes de retirar el baño de hielo durante 20 min. Se volvió a aplicar el baño de hielo. Después de 15 min se añadió aldehído de Garner (3,36 g, 14,65 mmol) en THF seco (10 mL) a lo largo de 5 min. Después de 20 min se retiró el baño de hielo. Una cromatografía en capa fina (TLC) después de 2,7 h mostró que el aldehído de Garner había desaparecido. La reacción se extinguió con NH_4Cl acuoso saturado (300 mL) y se extrajo con Et_2O (2 x 250 mL). Las fases de Et_2O reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y el filtrado se evaporó para producir el compuesto bruto **4** y su diastereómero *syn* (no se muestra en la figura 1) como un aceite amarillo (9,06 g). Este material después se utilizó en la siguiente etapa sin más purificación.

Compuesto 5. Para reducir el triple enlace en el compuesto **4**, el aceite se disolvió en Et_2O seco (100 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió lentamente RED-A1 (20 mL, al 65% en tolueno) a la disolución resultante a temperatura ambiente para controlar la producción de hidrógeno gaseoso (H_2). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche o hasta que una TLC mostró la desaparición del material de partida ($R_f = 0,6$ en EtOAc:hexanos 1:1) y se extinguió lentamente con MeOH frío o NH_4Cl acuoso para controlar la producción de H_2 . La suspensión blanca resultante se filtró a través de un lecho corto de Celite y el filtrado se extrajo con EtOAc (2 x 400 mL). Los extractos de EtOAc reunidos se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el filtrado se evaporó para producir el compuesto bruto **5** y su diastereómero *syn* (no se muestra en la figura 1) como un aceite amarillo (7,59 g).

Compuesto 6. El aceite que contenía el compuesto **5** se disolvió en MeOH (200 mL). Se añadió hidrato de PTSA (0,63 g) y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 1 día y después a 50 °C durante 2 días, tras lo cual una TLC sugiere que todo el material de partida (**5**) había desaparecido. Sin embargo, estaba presente algo del material polar, lo cual sugiere que el ácido había escindido parcialmente el grupo BOC. La reacción se trató añadiendo NH_4Cl acuoso saturado (400 mL) y se extrajo con éter (3 x 300 mL). Las fases etéreas reunidas se

secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el filtrado se evaporó hasta la sequedad, dejando 5,14 g de un aceite. Para volver a proteger la amina que se hubiese formado, el producto bruto se disolvió en CH₂Cl₂ (150 mL), al cual se le añadió BOC₂O (2,44 g) y TEA (1,7 g). Cuando una TLC (hexanos:EtOAc 1:1) mostró que ya no existía más material en la línea de base se añadió NH₄Cl acuoso saturado (200 mL) y, después de separar la fase orgánica, la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 200 mL). Los extractos reunidos se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el filtrado se concentró hasta la sequedad para producir un aceite amarillo (7,7 g) que se cromatografió sobre una columna de sílice utilizando un gradiente de hexanos/EtOAc (hasta 1:1) para separar los diastereómeros. Mediante una TLC utilizando PE/EtOAc 1:1, el R_f para el antiisómero, compuesto **6**, se determina que es 0,45. Para el isómero syn (no se muestra en la figura 1), el R_f fue de 0,40. El rendimiento del compuesto **6** fue de 2,45 g (39% global basado en el aldehído de Garner).

RMN de ¹H del antiisómero (CDCl₃) δ 1,26 (s, 20H), 1,32 (s, 9H), 1,45 (s, 9H), 1,56 (quintete, 2H, J = 8 Hz), 2,06 (q, 2H, J = 7 Hz), 2,52 (t, 2H, J = 7 Hz), 2,55 (s, 2H), 3,60 (s, 1H), 3,72 (ddd, 1H, J = 11,5 Hz, 7,0 Hz, 3,5 Hz), 3,94 (dt, 1H, J = 11,5 Hz, 3,5 Hz), 4,32 (d, 1H, J = 4,5 Hz), 5,28 (s, 1H), 5,54 (dd, 1H, J = 15,5 Hz, 6,5 Hz), 5,78 (dt, 1H, J = 15,5 Hz, 6,5 Hz); RMN de ¹³C(¹H) (CDCl₃) δ 156,95, 134,80, 129,66, 80,47, 75,46, 63,33, 56,17, 42,44, 32,98, 31,70, 30,58, 30,32, 30,31, 30,28, 30,20, 30,16, 30,00, 29,89, 29,80, 29,08, 29,03.

Anal. calculado para C₂₇H₅₃NO₄S: C, 66,48; H, 10,95; N, 2,87; Encontrado: C, 65,98; H, 10,46; N, 2,48.

Compuesto 7. A una disolución del compuesto de alcohol **6** (609,5 mg, 1,25 mmol) disuelto en piridina seca (2 mL) se le añadió CBr₄ (647,2 mg, 1,95 mmol, 1,56 equiv.). El matraz se enfrió en un baño de hielo y se añadió gota a gota P(OMe)₃ (284,7 mg, 2,29 mmol, 1,84 equiv.) a lo largo de 2 min. Después de 4 min, el baño de hielo se retiró y después de 12 h la mezcla se diluyó con éter (20 mL). La mezcla resultante se lavó con HCl acuoso (10 mL, 2 N) para formar una emulsión que se separó tras una dilución con agua (20 mL). La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 10 mL), después con EtOAc (2 x 10 mL). Los extractos etéreos y el primer extracto con EtOAc se reunieron y se lavaron con HCl acuoso (10 mL, 2 N), agua (10 mL) y NaHCO₃ acuoso saturado (10 mL). El último extracto con EtOAc se utilizó para retroextraer los lavados acuosos. Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el filtrado se concentró para producir un producto bruto (1,16 g), que se purificó mediante una cromatografía de resolución rápida sobre sílice (columna de 3 x 22 cm) utilizando CH₂Cl₂ y después CH₂Cl₂-EtOAc (1:20, 1:6, 1:3 y 1:1, el producto comienza a eluir, 6:4, 7:3). Las fracciones tempranas contenían 56,9 mg de aceite. Las fracciones más tardías proporcionan el producto (compuesto **7**, 476,6 mg, 64%) como un aceite transparente incoloro.

Anal. calculado para C₂₉H₅₈NO₇PS (595,82): C, 58,46; H, 9,81; N, 2,35; Encontrado: C, 58,09; H, 9,69; N, 2,41.

Compuesto 8. Un matraz que contenía el compuesto **7** (333,0 mg, 0,559 mmol) y una barra de agitación se sometió al vacío y se rellenoó con nitrógeno. Se inyectó acetonitrilo (4 mL, destilado de CaH₂) mediante una jeringa y el matraz, que ahora contiene una disolución, se enfrió en un baño de hielo. Utilizando una jeringa se añadió (CH₃)₃SiBr (438,7 mg, 2,87 mmol, 5,13 equiv.) a lo largo de 1 min. Después de 35 min, la parte superior del matraz se enjuagó con una porción más de acetonitrilo (1 mL) y se retiró el baño de hielo. Después de 80 min más, se retiró una parte alícuota, la disolución se secó soplando nitrógeno gaseoso sobre ella y el residuo se analizó mediante RMN de ¹H en CDCl₃, que mostró sólo trazas de picos atribuibles a restos P-OCH₃. Después de 20 min se añadió agua (0,2 mL) a la mezcla de reacción, seguido de la disolución de CDCl₃ empleada para analizar la parte alícuota y la mezcla se concentró hasta un volumen de aproximadamente 0,5 mL en un evaporador rotatorio. Utilizando acetona (3 mL) en porciones, el residuo se trasladó a un tubo de ensayo tarado, formando una disolución de color marrón pálido. Se añadió agua (3 mL) en porciones. Después de la adición de 0,3 mL se observó una turbidez. Después de un total de 1 mL se había formado un precipitado gomoso. A medida que se añadían 0,6 mL más de agua apareció más turbidez y se separó más goma, pero la porción final de agua no pareció cambiar el aspecto de la mezcla. En total, este proceso se realizó a lo largo de varias horas. El tubo se centrifugó y el sobrenadante se retiró con una pipeta. El sólido, que ya no era gomoso, se secó sobre P₄O₁₀ al vacío, dejando el compuesto **8** (258,2 mg, 95%) como un monohidrato.

Anal. calculado para C₂₂H₄₆NO₅PS+H₂O (485,66): C, 54,40; H, 9,96; N, 2,88; Encontrado: C, 54,59; H, 9,84; N, 2,95.

Compuesto 9. El compuesto **8** (202,6 mg, 0,417 mmol) se añadió en una caja enguantada a un tubo de ensayo que contenía una barra de agitación, THF seco (3 mL) y HOAc glacial (3 mL). Se añadió NBSCI (90 mg, 0,475 mmol, 1,14 equiv.) y después de 0,5 h se obtuvo una disolución transparente. Después de un total de 9 h se evaporó una parte alícuota hasta la sequedad y el residuo se analizó mediante RMN de ¹H en CDCl₃. Los picos que correspondían a CH₂StBu y CH₂SSAr sugieren que la reacción se había completado hasta aproximadamente 75% y la comparación del espectro con el espectro de NBSCI puro en CDCl₃ sugiere que ya no había reactivos presentes en la reacción. Por tanto, se añadió otra porción (24,7 gm, 0,130 mmol, 0,31 equiv.), seguida 3 horas después por otra porción (19,5 mg, 0,103 mmol, 0,25 equiv.). Después de otra hora, la mezcla se trasladó a un nuevo tubo de ensayo utilizando THF (2 mL) para enjuagar y se añadió agua (1 mL).

Compuesto 10. Se añadió PMe₃ (82,4 mg, 1,08 mmol, 1,52 veces la cantidad total de cloruro de 2-nitrobenzensulfonilo añadida) a la disolución transparente del compuesto **9** descrita anteriormente. La mezcla se volvió caliente y turbia, formándose un precipitado a lo largo del tiempo. Después de 4,5 h se añadió metanol y el

tubo se centrifugó. El precipitado se sedimentó con dificultad, ocupando 1 cm del fondo del tubo. El sobrenadante de color amarillo claro se retiró utilizando una pipeta. Se añadió metanol (5 mL, desoxigenado con nitrógeno), el tubo se centrifugó y el sobrenadante se retiró con una pipeta. Este ciclo se repitió tres veces. Cuando se concentró, el lavado con metanol final sólo dejó 4,4 mg de un residuo. La masa del residuo sólido se secó sobre P₂O₁₀ al vacío, dejando el compuesto **10** (118,2 mg, 68%) como un monohidrato.

Anal. calculado para C₁₈H₃₈NO₃S+HCl (417,03): C, 51,84; H, 9,43; N, 3,36; Encontrado: C, 52,11; H, 9,12; N, 3,30.

Compuesto 11. El compuesto **6** (1,45 g, 2,97 mmol) se disolvió en AcOH (20 mL) y se añadió NBSCI (0,56 g, 2,97 mmol) de una vez. La reacción se dejó en agitación durante 3 h o hasta que desapareció el material de partida y se observó la aparición del producto mediante TLC (R_f del producto = 0,65, R_f del material de partida = 0,45, EtOAc/hexanos 1:1). La reacción se concentró hasta la sequedad en una línea de alto vacío y el residuo se disolvió en THF/H₂O (100 mL de 10:1).

Compuesto 12. Se añadió Ph₃P (0,233 g, 8,91 mmol) en una porción a la anterior disolución que contenía el compuesto **11** y la reacción se dejó en agitación durante 3 horas o hasta que el material de partida hubo desaparecido. La mezcla de reacción bruta se concentró hasta la sequedad en una línea de alto vacío, dejando un residuo que contenía el compuesto **12**.

Compuesto 13. El anterior residuo que contenía el compuesto **12** se disolvió en DCM (50 mL) y TFA (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y se concentró hasta la sequedad. El residuo se cargó sobre una columna con gel de sílice y se cromatografió con DCM puro, seguido de DCM que contenía MeOH al 5%, después MeOH al 10%, para producir el producto final, el compuesto **13**, como un sólido blanco pegajoso (0,45 g, 46% de rendimiento de **5**).

RMN de ¹H (CDCl₃) δ 1,27 (s), 1,33 (m a), 1,61 (p, 2H, J = 7,5 Hz), 2,03 (d a, 2H, J = 7 Hz), 2,53 (q, 2H, J = 7,5 Hz), 3,34 (s a, 1H), 3,87 (d a, 2H, J = 12 Hz), 4,48 (s a, 2H), 4,58 (s a, 2H), 5,42 (dd, 1H, J = 15 Hz, 5,5 Hz), 5,82 (dt, 1H, J = 15 Hz, 5,5 Hz), 7,91 (s a, 4H); RMN de ¹³C(¹H) (CDCl₃) δ 136,85, 126,26, 57,08, 34,76, 32,95, 30,40, 30,36, 30,34, 30,25, 30,19, 30,05, 29,80, 29,62, 29,09, 25,34.

25 Ejemplo 2: Esquemas sintéticos para preparar ácidos grasos tiolados

La estrategia sintética descrita en este ejemplo detalla la preparación de un ácido graso tiolado para ser incorporado en una estructura lipídica más compleja que después puede complejarse con una proteína u otro portador y administrarse a un animal para provocar una respuesta inmunológica. La estrategia utiliza la química orgánica convencional. Un esquema que muestra la estrategia de este ejemplo se proporciona en la figura 2 y los números de los compuestos en la siguiente descripción sintética se refieren a las estructuras numeradas en la figura 2.

Se describen dos síntesis. La primera síntesis, para un ácido graso tiolado C-12, comienza con el ácido 12-docecanoico disponible en el mercado, **14**. Después el bromo es desplazado por t-butiltiol para producir el ácido graso tiolado C-12 protegido, compuesto **15**. La segunda síntesis, para un ácido graso tiolado C-18, comienza con el 9-bromononanol disponible en el mercado (compuesto **16**). El grupo hidroxilo en el compuesto **16** se protege mediante la adición de un grupo dihidropirano y el compuesto resultante, **17**, se dimeriza mediante la activación de la mitad del material bromado mediante una reacción de Grignard, seguido de la adición de la otra mitad. El 18-hidroxiocetadecanol (compuesto **18**) producido después de la retirada catalizada por ácido del grupo protector de dihidropirano se monobroma selectivamente para formar el compuesto **19**. Durante esta reacción, aproximadamente la mitad de los grupos alcohol se activa para la sustitución nucleófila mediante la formación de un éster de ácido metansulfónico. El alcohol entonces se oxida para formar el ácido 18-bromocarboxílico, compuesto **20**, que después se trata con t-butiltiol para desplazar el bromo y formar el ácido graso C-18 tiolado protegido, compuesto **21**.

Los ácidos grasos tiolados protegidos, cada uno un t-butil tioéter, pueden incorporarse a un lípido complejo y el grupo protector puede retirarse utilizando, por ejemplo, una de las estrategias de desprotección descritas en los ejemplos 1 y 3. El tiol libre resultante puede utilizarse para complejarse con una proteína u otro portador antes de inocular al animal con el hapteno.

A. Síntesis de un ácido graso tiolado C-12

Compuesto 15. Se añadió t-butiltiol (12,93 g, 143 mmol) a un matraz de Schlenk seco y se utilizaron métodos de Schlenk para colocar al sistema en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió THF seco desgasificado (250 mL) y el matraz se enfrió en un baño de hielo. Se añadió lentamente n-BuLi (55 mL de 2,5 M en hexanos, 137,5 mmol) a lo largo de 10 min mediante una jeringa. La mezcla se dejó en agitación a 0 °C durante una hora. El bromoácido, compuesto **14** (10 g, 36 mmol) se añadió como un sólido y la reacción se calentó y se agitó a 60 °C durante 24 horas. La reacción se extinguió con HCl 2 M (250 mL) y se extrajo con éter (2 x 300 mL). Las capas etéreas reunidas se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y el filtrado se concentró mediante una evaporación rotatoria para producir el ácido de tioéter, compuesto **15** (10 g, rendimiento del 99%) como un polvo de color beige.

RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 1,25-1,35 (s a, 12H), 1,32 (s, 9H), 1,35-1,40 (m, 2H), 1,50-1,60 (m, 2H), 1,60-1,65 (m, 2H), 2,35 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 2,52 (t, 2H, J = 7,5 Hz); Se observó el ion principal en HRMS (ES-TOF) a m/z

311,2020, calculado para M+Na⁺ 311,2015.

B. Síntesis de un ácido graso tiolado C-12

5 Compuesto 17. Un matraz de Schlenk seco se cargó con el compuesto **16** (50 g, 224,2 mmol) y se disolvió en THF seco desgasificado (250 mL) destilado de sodio/benzofenona. El matraz se enfrió en un baño de hielo y después se añadió PTSA (0,5 g, 2,6 mmol). Después se añadió DHP seco desgasificado (36 g, 42,8 mmol) lentamente a lo largo de 5 min. Se dejó que la mezcla se calentase hasta la temperatura ambiente y se dejó en agitación durante la noche y se controló mediante TLC (PE:EtOAc 10:1) hasta que se consideró que la reacción se había completado por la desaparición completa de la mancha para el bromoalcohol. Entonces se añadió TEA (1 g, 10 mmol) para extinguir el PTSA. La mezcla después se lavó con una disolución de bicarbonato de sodio fría y se extrajo con EtOAc (3 x 250 mL). Las capas orgánicas después se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron para producir 68,2 g del producto bruto que se purificó mediante una cromatografía en columna (PE:EtOAc 10:1) para producir 60 g (99% de rendimiento) de un aceite incoloro.

10 RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 1,31 (s a, 6H), 1,41-1,44 (m, 2H), 1,51-1,62 (multipletes poco claros, 6H), 1,69-1,74 (m, 1H), 1,855 (quintete, J = 7,6 Hz, 2H), 3,41 (t, J = 7 Hz, 2H), 3,48-3,52 (m, 2H), 3,73 (dt, 2H, J = 6,5 Hz), 3,85-3,90 (m, 2H), 4,57 (t, 2H, J = 3 Hz).

20 Compuesto 18. Se añadieron virutas de magnesio (2,98 g, 125 mmol) a un matraz de Schlenk secado a la llama junto con un cristal de yodo. Entonces se añadió THF seco (200 mL) destilado de sodio y el sistema se desgasificó utilizando técnicas de Schlenk. Entonces se añadió lentamente el compuesto **17** (30 g, 97 mmol) al magnesio a lo largo de 10 min y la disolución se colocó en un baño de aceite a 65 °C y se dejó en agitación durante la noche. Se consideró que la reacción se había completado por TLC mediante la extinción de una parte alícuota con acetona y observando el cambio en el R_f en una mezcla PE:EtOAc 10:1. Después la disolución de Grignard se trasladó mediante una cánula a un matraz de tres bocas bajo una atmósfera de nitrógeno que contenía más compuesto **17** (30 g, 97 mmol). El matraz que contenía la mezcla resultante después se enfrió hasta 0 °C en un baño de hielo y entonces se añadió una disolución de Li₂CuCl₄ (3 mL de 1 M) mediante una jeringa. La mezcla de reacción se volvió de un color azul muy oscuro después de unos pocos minutos. La mezcla se dejó en agitación durante la noche. A la mañana siguiente se consideró que la reacción se había completado mediante TLC (PE:EtOAc 10:1), se extinguió con una disolución de NH₄Cl saturada y después se extrajo en éter (3 x 250 mL). Las capas etéreas se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron para producir el producto bruto (40 g), que se disolvió en MeOH. Entonces se añadió HCl concentrado (0,5 mL), lo cual produjo la formación de una emulsión blanca, que se dejó en agitación durante 3 h. La emulsión blanca entonces se filtró para producir 16 g (58% de rendimiento) del diol puro, compuesto **18**. RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ 1,26 (s a, 24H), 1,41-1,42 (m, 4H), 1,51-1,68 (m, 4H), 3,65 (t, 4H, J = 6,5 Hz).

35 Compuesto 19. El diol simétrico, compuesto **18** (11 g, 38,5 mmol), se añadió a un matraz de Schlenk seco bajo una atmósfera de nitrógeno y después se añadió THF seco (700 mL) destilado de sodio. El sistema se desgasificó y el matraz se colocó en un baño de hielo. Se añadió diisopropiletilamina (6,82 mL, 42,3 mmol) mediante una jeringa, seguido de MsCl (3,96 g, 34,4 mmol) añadido lentamente y la mezcla se dejó en agitación durante 1 hora. La reacción se extinguió con una disolución de NaH₂PO₄ saturada (300 mL) y después se extrajo con EtOAc (3 x 300 mL). Las capas orgánicas después se reunieron, se secaron con MgSO₄ y se concentraron para producir 14 g de una mezcla del diol, monomesilato y dimesilato. Una RMN muestra una mezcla 1:0,8 de protones CH₂OH:CH₂OMs. La mezcla después se disolvió en THF seco (500 mL), se desoxigenó y se le añadió LiBr (3,5 g, 40,23 mmol). La mezcla se dejó a reflujo durante la noche, tras lo cual la reacción se extinguió con agua (150 mL) y se extrajo con EtOAc (3 x 250 mL). La capa orgánica después se secó con MgSO₄ y se concentró para producir una mezcla de productos bromados que después se purificó mediante una cromatografía de resolución rápida (DCM) para producir el compuesto **19** (3,1 g, 25% de rendimiento) como un polvo blanco.

45 RMN de ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 1,26 (s a, 26H), 1,38-1,46 (m, 2H), 1,55 (quintete, 2H, J = 7,5 Hz), 1,85 (quintete, 2H, J = 7,5 Hz), 3,403 (t, 2H, J = 6,8 Hz), 3,66 (t, 2H, J = 6,8 Hz).

50 Compuesto 20. Un matraz de fondo redondo se cargó con el compuesto **19** (2,01 g, 5,73 mmol) y el sólido se disolvió en acetona de calidad de reactivo (150 mL). De modo simultáneo se preparó reactivo de Jones disolviendo CrO₃ (2,25 g, 22 mmol) en H₂SO₄ (4 mL) y después añadiendo lentamente 10 mL de agua fría y dejando la disolución en agitación durante 10 min. Entonces se añadió el reactivo de Jones frío al matraz de fondo redondo lentamente a lo largo de 5 min, tras lo cual la disolución se agitó durante 1 h. La disolución naranja resultante se volvió verde tras varios minutos. La mezcla después se extinguió con agua (150 mL) y se extrajo dos veces en éter (3 x 150 mL). Las capas etéreas después se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron para producir el compuesto **20** (2,08 g, 98% de rendimiento) como un polvo blanco.

55 RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ 1,27 (s a, 26H), 1,58-1,71 (m, 2H), 1,77-1,97 (m, 2H), 2,36 (t, 2H, J = 7,4 Hz), 3,42 (t, 2H, J = 7 Hz).

Compuesto 21. Se añadió t-butiltiol (11,32 g, 125 mmol) a un matraz de Schlenk seco y se disolvió en THF seco (450 mL) destilado de sodio. La disolución se desoxigenó burbujeando nitrógeno a través de ella antes de colocar el matraz en un baño de hielo. Entonces se añadió una disolución de n-BuLi en hexanos (70 mL de 1,6 M) lentamente

mediante una jeringa a lo largo de 10 min. Esta mezcla se dejó en agitación durante 1 hora, después se añadió el compuesto **20** (5,5 g, 16,2 mmol) y la disolución se mantuvo a reflujo a 60 °C durante la noche. A la mañana siguiente una parte alícuota se trató, se analizó mediante RMN y se consideró que la reacción se había completado. La reacción se extinguió con HCl (200 mL de 2 M) y se extrajo con éter (3 x 250 mL). Las capas etéreas después se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y el filtrado se concentró para producir el producto, compuesto **21**, como un sólido blanco (5 g, 90% de rendimiento).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1,26 (s a, 26H), 1,32 (s a, 9H), 1,48-1,70 (m, 4H), 2,35 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz), 2,52 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) δ 24,69, 28,35, 29,05, 29,21, 29,28, 29,39, 29,55, 29,89, 31,02(3C), 33,98, 41,75, 179,60.

10 **Ejemplo 3: Esquema sintético para preparar un análogo tiolado de LPA**

La estrategia sintética descrita en este ejemplo da como resultado la preparación de LPA tiolado. El análogo de LPA después puede complejarse con un portador, por ejemplo un portador de proteína, que entonces puede administrarse a un animal para provocar una respuesta inmunogénica contra LPA. Esta estrategia utiliza reacciones de química orgánica y enzimáticas, cuyo esquema se proporciona en la figura 3. Los números de los compuestos en la siguiente descripción sintética se refieren a las estructuras numeradas en la figura 3.

Los materiales de partida fueron el compuesto **15** en el ejemplo 2 y glicerofosfocolina enantioméricamente pura (compuesto **22**). Estos dos compuestos químicos se combinaron para producir el producto diacetilado, compuesto **23**, utilizando DCC para facilitar la esterificación. En una variante del proceso sintético, la glicerofosfocolina diacetilada resultante se trató primero con fosfolipasa-A2 para retirar el ácido graso en la posición sn-2 del esqueleto de glicerol para producir el compuesto **24**. Esta sustancia después se trató con otra enzima, fosfolipasa-D, para eliminar la colina y formar el compuesto **26**. En otra variante del proceso sintético, el tratamiento con fosfolipasa-D precede a un tratamiento con fosfolipasa-A2 para producir el compuesto **25** y el tratamiento del compuesto **25** con fosfolipasa-D después produce el compuesto **26**. Ambas variantes conducen al mismo producto, el derivado de ácido fosfatídico, compuesto **26**. Entonces se retira el grupo protector de t-butilo en el compuesto **26**, primero utilizando triflato de disulfuro de trimetilo para producir el compuesto **27**, seguido de una reducción del disulfuro para producir el derivado de LPA deseado, compuesto **28**. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, también puede utilizarse la secuencia de reacción de nitrobenzilsulfenilo descrita en el ejemplo 1 para producir el compuesto **28**.

Compuesto 23. A un matraz de Schlenk secado a la llama se le añadió el ácido de tioéter, compuesto **15** (10 g, 35,8 mmol), compuesto **22** (complejo de glicerofosfocolina- CdCl_2 , 4,25 g, 8,9 mmol), DCC (7,32 g, 35,8 mmol) y DMAP (2,18 g, 17,8 mmol), tras lo cual el matraz se sometió al vacío y se rellenó con nitrógeno. Se añadió una cantidad mínima de DCM seco desgasificado (100 mL), dando como resultado una mezcla turbia. El matraz se cubrió con una lámina de aluminio y se dejó en agitación hasta que la reacción se completó, según se muestra mediante TLC (sílice, $\text{DCM}:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ concentrado 10:5:1). La insolubilidad del compuesto **16** imposibilitó el control de su desaparición mediante TLC, pero la reacción se detuvo cuando se consideró que la intensidad de la mancha del producto de R_f 0,1 dejó de aumentar. Esto generalmente requiere de 3 a 4 días y en algunos casos la adición de más DCC y DMAP. Tras completarse, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró para producir un aceite amarillo, que se purificó utilizando una cromatografía de resolución rápida utilizando el sistema disolvente descrito anteriormente para producir 3,6 g (rendimiento del 50%) de una cera transparente que contenía una mezcla del compuesto **23** y productos monoacetilados en una proporción de 5 a 1, según se calcula comparando las integrales para los picos de los restos $(\text{CH}_3)_3\text{N}^-$, CH_2StBu y $-\text{CH}_2\text{COO}^-$. El análisis del aceite mediante HRMS (ESI-TOF) produjo un ion prominente a m/z 820,4972, calculado para $\text{M}+\text{Na}^+ = \text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{NNaO}_8\text{PS}_2^+$ 820,4960.

A. Variante de síntesis 1: tratamiento con fosfolipasa-A2

Compuesto 24. Una mezcla del compuesto 23 y los productos monoacetilados según se describió anteriormente (3,1 g, 3,9 mmol) se disolvió en Et_2O (400 mL) y metanol (30 mL). Se añadió tampón borato (100 mL, pH 7,4, 0,1 M, 0,072 mM en CaCl_2), seguido de fosfolipasa-A2 (procedente de veneno de abeja, 130 unidades, Sigma). La mezcla resultante se dejó en agitación durante 10 h, tras lo cual una TLC (sílice, $\text{MeOH}:\text{agua}$ 4:1; el sistema disolvente previo, $\text{DCM}:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ concentrado 10:5:1, demostró ser ineficaz) demostró la ausencia de material de partida ($R_f = 0,7$) y la aparición de una nueva mancha ($R_f = 0,2$). Las capas orgánica y acuosa se separaron y la capa acuosa se lavó con éter (2 x 250 mL). El producto se extrajo de la capa acuosa con una mezcla de $\text{DCM}:\text{MeOH}$ (2:1, 2 x 50 mL). Las capas orgánicas después se concentraron mediante una evaporación rotatoria para producir un producto en forma de una cera blanca (1,9 g, 86% de rendimiento), que una RMN demostró que era un producto puro (compuesto **24**).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1,25-1,27 (s a, 12H), 1,31 (s, 9H), 1,35-1,45 (m, 2H), 1,52-1,60 (m, 4H), 2,31 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 2,51 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 3,28 (s a, 9H) 3,25-3,33 (s a, 2H), 3,78-3,86 (m, 1H), 3,88-3,96 (m, 2H), 4,04-4,10 (m, 2H), 4,26-4,34 (m, 2H). El análisis de la cera mediante HRMS (ESI-TOF) produjo un ion prominente a m/z 550,2936, calculado para $\text{M}+\text{Na}^+$ 550,2943 ($\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{NNaO}_7\text{PS}_2^+$) y un m/z a 528,3115, calculado para MH^+ 528,3124 ($\text{C}_{24}\text{H}_{51}\text{NO}_7\text{PS}_2^+$).

Anal. calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{NO}_7\text{PS} + 2 \text{H}_2\text{O}$ (563,73): C, 51,13; H, 9,66; N, 2,48; Encontrado: C, 50,90; H, 9,37; N,

2,76.

5 Compuesto 26. El liso-compuesto **24** (1,5 g, 2,7 mmol) se disolvió en una mezcla de sec-butanol (5 mL) y Et₂O (200 mL) y la mezcla turbia resultante se sonicó hasta que se disipó la turbidez. Se añadió tampón (200 mL, pH 5,8, NaOAc 0,2 M, CaCl₂ 0,08 M), seguido de extracto de col (80 mL de extracto de col de Savoy (que contiene fosfolipasa-D), que contiene 9 mg de proteína/mL). La reacción se agitó durante 1 día y se controló mediante TLC (C₁₈ RP SiO₂, ACN:agua 5:1), R_f del material de partida y del producto = 0,3 y 0,5, respectivamente. Para estimular a la reacción para que se completase se añadió otra porción de extracto de col (50 mL) según fue necesario y la reacción se agitó un día más. Este proceso se repitió dos veces más, según fue necesario para completar la conversión. Cuando la reacción se completó, la mezcla se concentró en un evaporador rotatorio para eliminar el éter y después se añadió una disolución de EDTA (0,5 M, 25 mL) y el producto se extrajo en una mezcla 5:4 de MeOH:DCM (300 mL). La concentración de la capa orgánica, seguido de una recristalización del residuo en DCM y acetona, produjo el producto puro (0,9 g, 75% de rendimiento).

10 RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ 1,25-1,27 (s a, 12H), 1,33 (s, 9H), 1,52-1,60 (m, 4H), 2,34 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 2,52 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 3,6-3,8 (s a, 1H), 3,85-3,97 (s a, 2H), 4,02- 4,18 (m, 2H).

15 Compuesto 27. La muestra de LPA protegido, compuesto **26** (0,150 g, 0,34 mmol) se lavó con metanol y se añadió a un vial en la caja enguantada. Esto después se suspendió en una mezcla de AcOH:THF (1:1, 10 mL) pero nunca se disolvió completamente incluso después de 1 h de sonicación. Entonces se añadió [Me₂SSMe]OTf sólido (0,114 g, 0,44 mmol). Esto se dejó en agitación durante 18 h. La reacción se controló retirando una parte alícuota, concentrándola hasta la sequedad al vacío y redisolviendo o suspendiendo el residuo en CD₃OD para observar el desplazamiento de RMN de ¹H del pico de CH₂ más cercado al azufre. El material de partida tenía un pico a 2,52 ppm, mientras que el disulfuro asimétrico formado en esta unión tenía un pico a aproximadamente 2,7 ppm. Este material (compuesto **27**) no se aisló más ni se caracterizó.

20 Compuesto 28. La mezcla que contenía el compuesto **27** se trató con agua (100 mL), seguido inmediatamente por PMe₃ (0,11 g, 1,4 mmol). Después de agitar durante 3 h, el disolvente se eliminó al vacío para producir un sólido blanco insoluble. Se añadió metanol (5 mL), la mezcla se centrifugó y el licor madre se decantó. Una concentración al vacío produjo 120 mg (91% de rendimiento) del compuesto **28**, un sólido de color beige. El compuesto **28** es un hapteno de LPA tiolado que puede conjugarse con un portador, por ejemplo albúmina o KLH, a través de la formación de enlaces disulfuro. Caracterización del compuesto **28**:

30 RMN de ¹H (CD₃OD:CD₃CO₂D 1:1, 500 MHz) δ 1,25-1,35 (s a, 12H), 1,32-1,4 (m, 2H), 1,55-1,6 (m, 4H), 2,34 (t, 2H, J = 7), 2,47 (t, 2H, J = 8,5), 3,89-3,97 (s a, 2H), 3,98-4,15 (m, 2H), 4,21 (m, 1H). El ion negativo ES de la muestra disuelta en metanol produjo un ion predominante a m/z = 385,1.

Ejemplo 4: Anticuerpos contra S1P

35 Un tipo de anticuerpo terapéutico se une específicamente a esfingolípidos no deseados para lograr efectos beneficiosos tales como, por ejemplo: (1) disminuir la concentración eficaz de esfingolípidos tóxicos indeseables (y/o la concentración de sus precursores metabólicos) que pueden estimular un efecto indeseable, tal como un efecto cardiotóxico, tumorigénico o angiogénico; (2) inhibir la unión de esfingolípidos tóxicos, indeseables, tumorigénicos o angiogénicos a un receptor celular para estos y/o disminuir la concentración de un esfingolípidos que esté disponible para la unión a dicho receptor. Los ejemplos de dichos efectos terapéuticos incluyen, pero no se limitan al uso de anticuerpos anti-S1P para disminuir la concentración sérica *in vivo* de S1P disponible, bloqueando con ello o al menos limitar los efectos tumorigénicos y angiogénicos de S1P y su papel en la insuficiencia cardíaca tras MI, el cáncer, o enfermedades fibrogénicas.

40 La S1P tiolada (compuesto **10** de la figura 1) se ha sintetizado para que contenga un grupo reactivo (es decir, un grupo sulfhidrilo) capaz de entrecruzar las características estructurales fundamentales de S1P a un resto portador, tal como KLH. Antes de la inmunización, el análogo de tio-S1P se conjuga, a través de un entrecruzamiento con IOA o SMCC, con portadores proteicos (por ejemplo, KLH) utilizando protocolos convencionales. El SMCC es un entrecruzador heterobifuncional que reacciona con aminas primarias y grupos sulfhidrilo y representa un entrecruzador preferido.

45 Ratones Swiss Webster o BALB-C se inmunizaron cuatro veces a lo largo de un periodo de dos meses con 50 mg de inmunógeno (conjugado producido con SMCC de S1P-tiolada y KLH) por inyección. Se recogieron muestras de suero dos semanas después de la segunda, tercera y cuarta inmunización y se seleccionaron mediante una ELISA directa para la presencia de anticuerpos anti-S1P. Después se utilizaron los bazo de los animales que mostraron altas titulaciones del anticuerpo, para generar hibridomas mediante procedimientos de fusión convencionales. Los hibridomas resultantes se cultivaron hasta la confluencia, tras lo cual el sobrenadante celular se recogió para un análisis ELISA. De los 55 ratones que se inmunizaron, 8 fueron buenos respondedores y muestran unas significativas titulaciones séricas de anticuerpos reactivos contra S1P. Después se realizaron las fusiones utilizando los bazo de estos ratones y células de mieloma según procedimientos establecidos. Los 1.500 hibridomas resultantes después se seleccionaron mediante ELISA directo, produciendo 287 hibridomas positivos. De estos 287 hibridomas seleccionados mediante ELISA directo, 159 mostraron titulaciones significativas. Cada uno de los 159

hibridomas después se expandió en placas de 24 pocillos. El medio condicionado para las células de los hibridomas expandidos después se reseleccionó para identificar los hibridomas estables capaz de segregar los anticuerpos de interés. Se realizaron ELISA competitivos con los 60 hidromas estables con mayor titulación.

5 De los 55 ratones y casi 1.500 hibridomas seleccionados, se descubrió un hibridoma que mostraba características de actuación que justificaban una clonación de dilución limitada, tal como se requiere para generar en último término un verdadero anticuerpo monoclonal. Este proceso produce 47 clones, la mayoría de los cuales se consideraron positivos para la producción de anticuerpos S1P. De estos 47 clones, 6 fueron expandidos en placas de 24 pocillos y después se seleccionaron mediante ELISA competitivo. De los 4 clones que siguieron siendo positivos se eligió uno para iniciar la producción a gran escala del anticuerpo monoclonal S1P. Ratones SCID fueron inyectados con estas
10 células y el líquido de ascitis resultante se purificó de la proteína A (rendimiento del 50%) y se analizó para los niveles de endotoxinas (<3 EU/mg). En una ronda de producción de líquido de ascitis se inyectaron 50 ratones, que produjeron un total de 125 mL de líquido de ascitis. Se determinó que el isotipo de los anticuerpos era IgG1 kappa y se consideró que eran >95% puros mediante HPLC. El anticuerpo se preparó en fosfato de sodio 20 mM con cloruro de sodio 150 mM (pH 7,2) y se conservó a -70 °C.

15 El clon de hibridoma positivo (denominado clon 306D326.26) se depositó en el ATCC (n° de almacenaje en la caja de seguridad SD-5362) y representa el primer mAb murino dirigido contra S1P. El clon también contiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que pueden utilizarse para la generación de un variante de anticuerpo "humanizado", así como la información de secuencia necesaria para construir un anticuerpo quimérico.

20 La selección del suero y del sobrenadante celular para anticuerpos específicos de S1P se realizó mediante un ELISA directo empleando el análogo de S1P tiolado descrito en el ejemplo 1 (es decir, el compuesto **10**) como antígeno. Se realizó un ELISA convencional, según se describe a continuación, excepto que se diluyeron 50 ul de muestra (suero o sobrenadante celular) con un volumen igual de PBS/Tween-20 al 0,1% (PBST) durante la incubación primaria. Se realizaron ELISA en placas de ELISA de elevada unión de 96 pocillos (Costar) revestidas con 0,1 mg de compuesto **10** químicamente sintetizado conjugado con BSA en tampón de ensayo (Na₂CO₃ 33,6
25 mM, NaHCO₃ 100 mM, pH 9,5). La S1P-tiolada-BSA se incubó a 37 °C durante 1 h a 4 °C durante la noche en pocillos de placas ELISA. Las placas después se lavaron cuatro veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10,14 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) y se bloquearon con PBST durante 1 h a temperatura ambiente. Para la etapa de incubación primaria se incubaron 75 ul de la muestra (que contiene la S1P que se va a medir) con
30 25 ul de mAb anti-S1P 0,1 ug/mL diluido en PBST y se añadieron a un pocillo de la placa ELISA. Cada muestra se introdujo en pocillos por triplicado. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, las placas ELISA se lavaron cuatro veces con PBS y se incubaron con 100 ul por pocillo de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra HRP 0,1 ug/mL (Jackson ImmunoResearch) durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron cuatro veces con PBS y se expusieron a tetrametilbenzidina (Sigma) durante 1-10 minutos. La reacción de detección se detuvo mediante la adición de un volumen igual de H₂SO₄ 1 M. Se determinó la densidad óptica de las muestras
35 mediante la medición a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA EL-X800 (Bio-Tech).

Para la reactividad cruzada se realizó un ELISA competitivo según se describió anteriormente, excepto por las siguientes alteraciones (figura 4). La incubación primaria consistió en el competidor (S1P, SPH, LPA, etc.) y un mAb anti-S1P conjugado con biotina. La biotinilación del anticuerpo monoclonal purificado se realizó utilizando el kit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation (Pierce). Se determinó la incorporación de biotina según el protocolo del kit y esta varía de 7 a 11 moléculas de biotina por anticuerpo. El competidor se prepara como sigue: disoluciones madre de lípidos se sonicaron y se secaron bajo una atmósfera de argón antes de su reconstitución en DPBS/BSA (BSA sin ácidos grasos 1 mg/mL (Calbiochem) en DPBS (Invitrogen 14040-133)). El mAb anti-S1P purificado se diluyó según fue necesario en PBS/Triton X-10 al 0,5%. Las disoluciones de los competidores y del anticuerpo se mezclaron para generar 3 partes de competidor por 1 parte de anticuerpo. Se empleó un anticuerpo secundario de estreptavidina conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) para generar la señal.
45

Otro aspecto de los datos del ELISA competitivo mostrados en la figura 4 es que se demuestra que el mAb anti-S1P fue incapaz de distinguir el análogo de S1P tiolado (compuesto **10**) de la S1P natural que se añadió en el experimento de competición. También se demuestra que el anticuerpo no reconoce ninguno de los productos de la oxidación, porque el análogo se construyó sin dobles enlaces (también es cierto para el análogo de LPA descrito en el ejemplo 3). El mAb anti-S1P también se ensayó contra el producto natural que contiene el doble enlace, que se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 48 horas. Se realizó una HPLC en fase inversa de la S1P natural según los métodos indicados previamente (Deutschman, *et al.* (julio 2003), Am. Heart J., vol. 146(1):62-68) y los resultados demuestran que no hay diferencia en los tiempos de retención. Además, una comparación de las características de unión del anticuerpo monoclonal con los diversos lípidos mostrados en la figura 4 indica que el epitopo reconocido por el anticuerpo no implica a la cadena hidrocarbonada en la región del doble enlace de la S1P natural. Por otra parte, el epitopo reconocido por el anticuerpo monoclonal es la región que contiene el aminoalcohol sobre el esqueleto de base de la esfingosina más el fosfato libre. Si el fosfato libre está unido a una colina (como es el caso de SPC), entonces la unión es algo reducida. Si el grupo amino se esterifica para producir un ácido graso (como es el caso de C1P), no se observa unión del anticuerpo. Si el esqueleto de aminoalcohol de la esfingosina se sustituye por un esqueleto de glicerol (como es el caso de LPA), el anticuerpo monoclonal específico de S1P no muestra unión. Estos datos de cartografiado de epitopos indican que sólo existe un epitopo sobre S1P que es reconocido por el anticuerpo monoclonal y que este epitopo está definido por el grupo de cabeza polar exclusivo de
60

S1P.

En un experimento similar utilizando mediciones de ELISA, se evaluaron materiales control adecuados para asegurarse de que este anticuerpo monoclonal anti-S1P no reconoce el portador proteico ni el agente entrecruzador. Por ejemplo, el entrecruzador normal SMCC fue cambiado por IOA para la conjugación de la S1P-tiolada a BSA como material de depósito en el ELISA. Cuando se emplea IOA, las características de unión del anticuerpo fueron casi idénticas a cuando se emplea BSA-SMCC-S1P-tiolada. De modo similar, KLH fue cambiado por BSA como proteína que forma un complejo con S1P-tiolada para material de depósito. En este experimento no se observaron diferentes significativas en las características de unión del anticuerpo.

Cinética de unión: La cinética de unión de S1P a su receptor u otros restos ha sido siempre problemática debido a la naturaleza de los lípidos. Se han asociado muchos problemas a la insolubilidad de los lípidos. Para las mediciones BIAcore, este problema se soluciona inmovilizando directamente S1P a un chip de BIAcore. Entonces se hace fluir el anticuerpo sobre la superficie del chip y se miden las alteraciones en la densidad óptica para determinar las características de unión del anticuerpo a S1P. Para evitar la naturaleza de unión bivalente de los anticuerpos, la S1P se reviste sobre el chip a bajas densidades. Además, el chip se revistió con diversas densidades de S1P (7, 20 y 1000 RU) y los datos de unión del anticuerpo se ajustaron globalmente a un modelo de interacción 1:1. La figura 5 muestra los cambios en la densidad óptica debidos a la unión del anticuerpo monoclonal a S1P a tres densidades diferentes de S1P. En conjunto, se determinó que la afinidad del anticuerpo monoclonal por S1P era muy alta, en el intervalo de aproximadamente 88 picomolar (pM) a 99 nM, dependiendo de si se utilizó un modelo de unión monovalente o bivalente para analizar los datos de unión.

Ejemplo 5: Clonación y caracterización de los dominios variables de un anticuerpo monoclonal S1P

A. Introducción

La fabricación de productos biológicos es compleja, en parte debido a la complejidad asociada con la variabilidad de la propia proteína. Para los anticuerpos monoclonales (mAb), la variabilidad puede localizarse en el esqueleto proteico o en los restos carbohidrato unidos a estas proteínas glicosiladas. Por ejemplo, la heterogeneidad puede atribuirse a la formación de parejas de disulfuros alternativas, a la desamidación y formación de restos isoaspartilo, a la oxidación de la metionina y cisteína, a la ciclación de restos glutamina N-terminales para formar piroglutamato y a la ruptura enzimática parcial de lisinas C-terminales por carboxipeptidasas de mamífero. Por otra parte, la heterogeneidad de los carbohidratos introducida durante el cultivo celular incluye la adición diferencial de fucosa, otros enlaces de ramificación de manosa y la presencia diferencial de sialilación terminal. Además, puede realizarse una mutagénesis para alterar los patrones de glicosilación. La oxidación también es una fuente de problemas. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado recombinante HER2 sufre una oxidación en formulaciones líquidas cuando se expone a una luz intensa y elevadas temperaturas. De modo interesante, se ha indicado que dicha oxidación depende de la formulación (Lam, *et al.* (1997), *Pharm. Sci.*, vol. 86:1250-1255) y se ha indicado que la presencia de NaCl en la formulación provoca un aumento en la oxidación a temperaturas más altas después del contacto con recipientes de acero inoxidable o componentes de acero inoxidable en el proceso de rellenado. Se ha determinado que el resto metionina en la posición 255 de la cadena pesada de la región Fc es el principal sitio de oxidación. La oxidación se elimina suplementando el medio con metionina y tiosulfato provocado por los radicales libres generados por la presencia de iones metálicos e impurezas de peróxido en la formulación. Por razones como estas, habitualmente se aplican modificaciones del proceso a las moléculas de anticuerpos para mejorar sus propiedades, tales como una expresión potenciada en sistemas heterólogos, resistencia a proteasas, agregación reducida y estabilidad potenciada.

Este ejemplo indica la clonación de mAb murino contra S1P. Este anticuerpo, denominado Sphingomab™, es un anticuerpo monoclonal IgG1. La estrategia global consiste en clonar los dominios variables murinos de la cadena ligera (VL) y la cadena pesada (VH). La secuencia consenso de 306D VH demuestra que el fragmento de la región constante es coherente con un isotipo gamma-2b. Los dominios variables murinos se clonaron junto con el dominio constante de la cadena ligera (CL) y con el dominio constante de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3), dando como resultado una construcción de anticuerpo quimérico. Además, Sphingomab™ es exclusivo debido a la presencia de un resto cisteína libre en la región Fab en la posición 50 de la cadena pesada en la región CDR2. El reemplazamiento de este resto podría facilitar en gran medida los procesos de formulación y de fabricación, así como mejorar los rendimientos. En efecto, en un esfuerzo para mejorar las propiedades biofísicas de la molécula de anticuerpo, se realizó la sustitución del resto cisteína en la posición 50 por un panel de restos aminoácidos creando una serie de construcciones que contenían la sustitución deseada. Estas construcciones después se expresaron en células de mamífero y los diferentes variantes de anticuerpos se compararon en un ensayo ELISA para la unión a S1P. Comparado con el anticuerpo quimérico, los mutantes resultantes que portan la sustitución Cys50Ser y Cys50Arg muestran una ligera disminución en la unión a S1P, mientras que la sustitución de Cys por Phe o Ala no altera la unión a S1P.

B. Materiales y métodos**1. Clonación de genes de anticuerpos**

Un clon de la línea celular de hibridoma anti-S1P 306D326.1 (ATCC nº SD-5362) se cultivó en DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco con GlutaMAX™ I, D-glucosa 4500 mg/l, piruvato de sodio, Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, 111-035-003), FBS al 10% (clon fetal estéril I, Perbio Science) y 1x glutamina/penicilina/estreptomicina (Gibco/Invitrogen). El RNA total se aisló de 10⁷ células de hibridoma utilizando un procedimiento basado en el kit RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Alemania). El ARN se utilizó para generar ADNc de primera hebra siguiendo el protocolo del fabricante (kit de síntesis de primera hebra, Amersham Biosciences).

El ADNc de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) se amplificó mediante PCR utilizando un cebador MHV7 (MHV7: 5'-ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT-3' (SEQ ID NO:1)) en combinación con una mezcla de cebador de la región constante IgG2b MHCg1/2a/2b/3 (MHCg1: 5'-CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3' (SEQ ID NO:2); MHCg2a: 5'-CAGTGGATAGACCGATGGGGC-3' (SEQ ID NO:3); MHCg2b: 5'-CAGTGGATAGACTGATGGGGG-3' (SEQ ID NO:4); MHCg3: 5'-CAAGGGATAGACAGATGGGGC-3' (SEQ ID NO:5)). El producto de esta reacción se acopló al vector pCR2.1®-TOPO® (Invitrogen) utilizando una secuencia y un kit de clonación TOPO-TA®. El dominio variable de la cadena pesada después se amplificó mediante PCR de este vector y se insertó como un fragmento *Hind* III y *Apa* I y se acopló al vector de expresión pG1D200 (véase patente de EEUU nº 7.060.808) o pG4D200 (id.) que contiene el promotor HCMV, una secuencia conductora y la región constante gamma-1 para generar el plásmido pG1D200306DVH. La secuencia consenso de 306D V_H (figura 6; SEQ ID NO:6) demuestra que el fragmento de la región constante era coherente con un isotipo gamma-2b.

De modo similar, se amplificó la región variable de la cadena kappa de inmunoglobulina (VK) utilizando el cebador MKV 20 (5'-GTCTCTGATTCTAGGGCA-3' (SEQ ID NO:7)) en combinación con el cebador de la región constante kappa MKC (5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGG-3' (SEQ ID NO: 8)). El producto de esta reacción se acopló con el vector pCR2.1®-TOPO® utilizando una secuencia y un kit de clonación TOPO-TA®. El dominio variable de la cadena ligera después se amplificó mediante PCR de este vector y se insertó como un fragmento *Bam* HI y *Hind* III en el vector de expresión pKN 100 (véase la patente de EEUU nº 7.060.808) que contiene el promotor HCMV, una secuencia conductora y el dominio constante kappa humano, generando el plásmido pKN100306DVK.

Los plásmidos de cadena pesada y ligera pG1D200306DVH más pKN100306DVK se transformaron en bacterias DH4a y se conservaron en glicerol. Se preparó un ADN plasmídico a gran escala según es descrito por el fabricante (Qiagen, kit MAXIPREP™ sin endotoxinas). Muestras de ADN, purificadas utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen o el kit EndoFree Plasmid Mega/Maxi Kit, se secuenciaron utilizando un secuenciador automático ABI 3730xi, que también traduce las señales fluorescentes en su correspondiente secuencia de nucleobases. Se diseñaron cebadores en los extremos 5' y 3' de modo que la secuencia obtenida se solapa. La longitud de los cebadores era de 18-24 bases y preferiblemente contienen 50% de contenido en GC y ningún dímero predicho ni estructura secundaria. Las secuencias de aminoácidos para los dominios de V_H y V_L de ratón de Sphingomab™ se muestran en la figura 6 (SEQ ID NO:6 y 9, respectivamente). En la figura 6, los restos de CDR (véase Kabat, E.A. (1982), *Pharmacol. Rev.*, vol. 34: 23-38) están recuadrados, tal como se muestra a continuación en la tabla 1.

Tabla 1: Secuencias CDR de Sphingomab™ de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón

VL CDR	CDR
ITTTDIDDDMN (SEQ ID NO: 10)	CDR1
EGNLRP (SEQ ID NO: 11)	CDR2
LQSDNLPFT (SEQ ID NO: 12)	CDR3
VH CDR	
DHTIH (SEQ ID NO: 13)	CDR1
CISPRHDITKYEMFRG (SEQ ID NO: 14)	CDR2
GGFYGSTIWFDF (SEQ ID NO: 15)	CDR3

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos completas de varios dominios V_H y V_L de anticuerpos quiméricos se muestran en la figura 7. En la figura 7, las secuencias de aminoácidos están numeradas y las CDR identificadas, según el método de Kabat (Kabat, *et al.* (1991), NIH National Technical Information Service, pp. 1-3242).

2. Expresión de COS7

Para la expresión de anticuerpos en un sistema de mamífero no humano se transfectaron plásmidos en la línea celular de fibroblastos de riñón de mono verde africano COS7 mediante electroporación (0,7 mL a 10^7 células/mL) utilizando 10 ug de cada plásmido. Las células transfectadas se cultivaron en 8 mL de medio de cultivo durante 4 días. El anticuerpo quimérico 306SH1 x 306DVK-2 se expresó a 1,5 mg/mL en medio condicionado para células COS cotransfectado de modo transitorio. La unión de este anticuerpo a S1P se midió utilizando el ELISA de S1P.

Se determinó el nivel de expresión del anticuerpo quimérico en un ELISA cuantitativo como sigue. Se revistieron placas de microtitulación (inmunoplaaca Nunc MaxiSorp, Invitrogen) con 100 mL de partes alícuotas de anticuerpo IgG anti-humano de cabra 0,4 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO) diluido en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas después se lavaron tres veces con 200 mL/pocillo de tampón de lavado (1 x PBS, Tween al 0,1%). Se trasladaron partes alícuotas de 200 mL de cada muestra de suero diluida o sobrenadante de fusión a placas revestidas con toxina y se incubaron durante 37 °C durante 1 h. Después de 6 lavados con tampón de lavado, el conjugado de peroxidasa-cadena ligera kappa anti-humano de cabra (Jackson Immuno Research) se añadió a cada pocillo a una dilución 1:5000. La reacción se realizó durante 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron 6 veces con el tampón de lavado y se añadieron 150 mL de sustrato K-BLUE (Sigma) a cada pocillo, incubando en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 mL de disolución RED STOP (SkyBio Ltd.) y se determinó la absorción a 655 nm utilizando un lector de microplacas 3550 (Bio-Rad Laboratories Ltd.). Los resultados de los ensayos de unión de anticuerpos se muestran en la figura 8.

3. Expresión de 293F

Para la expresión de anticuerpos en un sistema humano se transfectaron plásmidos en la línea celular de riñón embrionario humano 293F (Invitrogen) utilizando 293-fectina (Invitrogen) y utilizando medio 293F-FreeStyle Media (Invitrogen) para el cultivo. Se transfectaron plásmidos de cadena ligera y de cadena pesada a 0,5 g/mL. Las transfecciones se realizaron a una densidad celular de 10^6 células/mL. Los sobrenadantes se recogieron mediante centrifugación a 1100 rpm durante 5 minutos a 25 °C tres días después de la transfección. Los niveles de expresión se cuantificaron mediante ELISA cuantitativo (véase a continuación) y varían de aproximadamente 0,25-0,5 g/mL para el anticuerpo quimérico.

4. ELISA cuantitativo

Placas ELISA de microtitulación (Costar) se revistieron con IgG anti-ratón de conejo específico para el fragmento F(ab')₂ (Jackson Immuno Research) o IgG anti-humano de conejo específico para el fragmento F(ab')₂ (Jackson Immuno Research) diluidos en tampón carbonato 1 M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 h. Las placas se lavaron con PBS y se bloquearon con PBS/BSA/Tween-20 durante 1 h a 37 °C. Para la incubación primaria, se añadieron a los pocillos diluciones de IgG de ratón o IgG humano no específicos de molécula completa (utilizados para la curva de calibración) y las muestras que se van a medir. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 ul por pocillo de anti-ratón (H+L) de cabra conjugado con HRP diluido 1:40.000 (Jackson Immuno Research) o anti-humano (H+L) de cabra conjugado con HRP diluido 1:50.000 (Jackson Immuno Research) durante 1 h a 37 °C. Después de lavar, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina (Sigma) y se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M. Se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm utilizando un Thermo Multiskan EX. Los datos brutos se trasladaron a un programa informático GraphPad para el análisis.

5. ELISA directo

Placas ELISA de microtitulación (Costar) se revistieron durante la noche con S1P diluida en tampón carbonato 1 M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 h. Las placas se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) y se bloquearon con PBS/BSA/Tween-20 durante 1 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Para la incubación primaria (1 h a temperatura ambiente) se construyó una curva patrón utilizando el mAb anti-S1P y las muestras que se van a ensayar para la unión, utilizando el siguiente conjunto de diluciones: 0,4 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,0125 mg/mL y 0 mg/mL y se añadieron 100 mL a cada pocillo. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 ul por pocillo de anti-ratón de cabra conjugado con HRP (dilución 1:20.000) (Jackson Immuno Research) o anti-humano (H+L) de cabra conjugado con HRP diluido 1:50.000 (Jackson Immuno Research) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina (Sigma) y se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M. Se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm utilizando un Thermo Multiskan EX. Los datos brutos se trasladaron a un programa informático GraphPad para el análisis.

La siguiente tabla 2 muestra un análisis comparativo de los mutantes con el anticuerpo quimérico. Para generar estos resultados, el anticuerpo unido fue detectado por un segundo anticuerpo, específico para la IgG de ratón o humana, conjugado con HRP. Se midió la reacción cromogénica y se indica como densidad óptica (DO). La concentración del panel de anticuerpos era de 0,1 ug/mL. No se detectó interacción del segundo anticuerpo con la matriz revestida con S1P sola.

Tabla 2

Dominio variable	Mutación	Plásmidos	Unión
HC	quimérico	pATH50 + pATH10	1,5
	CysAla	pATH50 + pATH11C1	2
	CysSer	pATH50 + pATH12C2	0,6
LC	CysArg	pATH50 + pATH14C1	0,4
	CysPhe	pATH50 + pATH16C1	2
	MetLeu	pATH53C1 + pATH10	1,6

Ejemplo 6: mAb quimérico contra S1P

5 Tal como se emplea en la presente, el término anticuerpo (o inmunoglobulina) "quimérico" se refiere a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera que es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivadas de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (Cabilly, *et al.*, 10 *supra*; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 81:6851 (1984)).

Se generó un anticuerpo quimérico contra S1P utilizando las regiones variables (Fv) que contienen las regiones de unión a S1P activas del anticuerpo murino a partir de un hibridoma concreto (nº de almacenaje en la caja de seguridad del ATCC SD-5362) con la región Fc de una inmunoglobulina IgG1 humana. Las regiones Fc contienen los dominios CL, ChL y Ch3 del anticuerpo humano. Sin estar limitados a ningún método, los anticuerpos quiméricos 15 también podrían haberse generado a partir de las regiones Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, o IgM humanas. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, pueden generarse anticuerpos "humanizados" injertando regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por ejemplo, CDR1-4) del mAb anti-S1P murino en regiones de marco de un anticuerpo humano (por ejemplo, Fr1, Fr4, etc.), tal como las regiones de marco de una IgF1. La figura 9 muestra la unión de los mAb quiméricos y totalmente murinos en una medición de ELISA directo utilizando S1P-tiolada como material de depósito. 20

Para los experimentos de ELISA directo mostrados en la figura 9, el anticuerpo quimérico contra S1P tiene unas características de unión similares al anticuerpo monoclonal totalmente murino. Se realizaron ELISA en placas ELISA de elevada unión de 96 pocillos (Costar) revestidas con 0,1 ug de S1P tiolada químicamente sintetizada conjugada con BSA en tampón de ensayo (Na₂CO₃ 33,6 mM, NaHCO₃ 100 mM, pH 9,5). La S1P-tiolada-BSA se incubó a 37 °C 25 durante 1 h o a 4 °C durante la noche en placas ELISA. Las placas después se lavaron cuatro veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10,14 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) y se bloquearon con PBST durante 1 h a temperatura ambiente. Para la etapa de incubación primaria se incubaron 75 ul de la muestra (que contiene la S1P que se va a medir) con 25 ul de anticuerpo monoclonal anti-S1P 0,1 ug/mL diluido en PBST y se añadieron a un pocillo de la placa ELISA. Cada muestra se introdujo en pocillos por triplicado. Después de 1 hora de incubación a 30 temperatura ambiente, las placas ELISA se lavaron cuatro veces con PBS y se incubaron con 100 ul por pocillo de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra HRP 0,1 ug/mL (Jackson Immunoresearch) durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron cuatro veces con PBS y se expusieron a tetrametilbenzidina (Sigma) durante 1-10 minutos. La reacción de detección se detuvo mediante la adición de un volumen igual de H₂SO₄ 1 M. Se determinó la densidad óptica de las muestras mediante la medición a 450 nm utilizando un lector de placas de 35 ELISA EL-X800 (Bio-Tech).

Tal como fue el caso con respecto a los experimentos descritos en el ejemplo 4, el método preferido para medir la titulación de los anticuerpos en el suero de un animal inmunizado o en medio condicionado para células (es decir, sobrenadante) de las células productoras de anticuerpos, tales como un hibridoma, implica revestir la placa de ELISA con un ligando diana (por ejemplo, un análogo tiolado de S1P, LPA, etc.) que se ha unido covalentemente a 40 una proteína portadora, tal como BSA.

Sin estar limitados a ningún método o ejemplo concretos, los anticuerpos quiméricos podrían generarse contra otras dianas lipídicas, tales como LPA, ceramidas, sulfatidas, cerebrósidos, cardiolipinas, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, eicosinoides y otros leucotrienos, etc. Además, muchos de estos lípidos también pueden glicosilarse y/o acetilarse, si se desea. 45

Ejemplo 7: Ensayo basado en anticuerpos para la esfingosina quinasa (SPH quinasa)

La esfingosina quinasa (SPH quinasa o SPHK) cataliza la conversión de SPH en S1P. Se ha descrito una secuencia genética que codifica la SPH-quinasa humana (Meléndez *et al.*, *Gene*, 251:19-26, 2000). Se han descrito tres homólogos humanos de la SPH quinasa (SKA, SKB y SKC) (solicitud de patente PCT publicada WO 00/52173).
 5 También se ha descrito una SPH quinasa murina (Kohama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:23722-23728, 1998; y solicitud de patente PCT publicada WO 99/61581). La solicitud de patente PCT publicada WO 99/61581 describe ácidos nucleicos que codifican una esfingosina quinasa. La solicitud de patente PCT publicada WO 00/52173 describe ácidos nucleicos que codifican homólogos de la esfingosina quinasa. También se han descrito otras SPH quinasa.
 10 Véase, por ejemplo, Pitson *et al.*, *Biochem. J.*, 350:429-441, 2000; solicitud PCT publicada WO 00/70028; Liu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:19513-19520, 2000; documento PCT/AUO 1/00539, publicado como WO 01/85953; documento PCT/USO 1/04789, publicado como WO 01/60990; y documento PCT/EPOO/09498, publicado como WO 01/31029.

Los inhibidores de SPH quinasa incluyen, pero no se limitan a N,N-dimetilesfingosina (Edsall *et al.*, *Biochem.*, 57:12892-12898, 1998); D-treo-dihidroesfingosina (Olivera *et al.*, *Nature*, 365:557-560, 1993); y bases esfingoides (Jonghe *et al.*, "Structure- Activity Relationship of Short-Chain Sphingoid Bases As Inhibitors of Sphingosine Kinase", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9:3175-3180, 1999).
 15

Los ensayos de SPH quinasa útiles para evaluar estos y otros inhibidores de SPH quinasa conocidos o potenciales incluyen los descritos por Olivera *et al.*, *Methods in Enzymology*, 311:215-223, 1999; Caligan *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 281 :36-44, 2000.

Se cree que la inhibición de SPH quinasa conduce a una acumulación de su sustrato, SPH, que, al igual que S1P puede ser un esfingolípido indeseable en ciertas condiciones. Para evitar o mitigar estos efectos indeseables puede administrarse un agente que (i) estimule una enzima que utiliza SPH como sustrato, con la condición de que la enzima no debe ser una enzima que produzca S1P como producto de reacción (tal como, por ejemplo, ceramida sintasa, véase a continuación); o (ii) inhiba una enzima produce SPH como producto.
 20

Sin estar limitados a ningún método concreto, los anticuerpos anti-S1P (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-S1P) puede utilizarse como reactivo en un ensayo *in vitro* para la actividad SPH quinasa. Por ejemplo, puede añadirse SPHK purificada a los pocillos de una placa de microtitulación en presencia de PBS y el sustrato para la quinasa, SPH (complejado, por ejemplo, con BSA sin ácidos grasos). El producto de la reacción resultante, S1P, después puede someterse a un ELISA utilizando un anticuerpo anti-S1P (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-S1P descrito anteriormente en el ejemplo 4). En este ensayo, la inhibición de SPHK por un compuesto de ensayo produciría menores niveles de S1P que una reacción control que no incluye un compuesto inhibidor de SPHK. Este ensayo puede configurarse para una alta capacidad de procesamiento y así puede actuar como base de un ensayo de selección de alta capacidad de procesamiento para moduladores de la actividad SPHK.
 25
 30

Ejemplo 8: Ensayo basado en anticuerpos para las actividades S1P liasa o SPP

La estimulación de enzimas que catalizan reacciones que degradan la S1P (es decir, reacciones que utilizan la S1P como reactante) dará como resultado la estimulación de la degradación de moléculas de S1P. Estas enzimas incluyen, pero no se limitan a:
 35

S1P liasa: La S1P liasa cataliza la conversión de S1P a etanolamina-P (también denominada t-2-hexadecanal) y palmitaldehído (Veldhoven *et al.*, *Adv. Lipid Res.*, 26:67-97, 1993; Van Veldhoven, *Methods in Enzymology*, 311:244-254, 1999). Se han descrito genes de S1P liasa de levadura (Lanterman *et al.*, *Biochem. J.*, 552:525-531, 1998), murinos (Zhou *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 242:502-507, 1998) y humanos (solicitud de patente PCT publicada WO 99/38983). La solicitud de patente PCT publicada WO 99/16888 describe secuencias de proteína y de ADN de S1P liasa. La patente de EEUU nº 6.187.562 y la solicitud de patente PCT publicada WO 99/38983 también describen una S1P liasa.
 40

Pueden desarrollarse ensayos de ganancia de función para descubrir compuestos de molécula pequeña que activen la liasa o que aumenten la expresión del gen que la codifica. Sin estar limitados a ningún método concreto, se pueden utilizar anticuerpos anti-S1P en un formato de ELISA para medir la producción de S1P a partir de SPH añadida en formatos basados en células o *in vitro*. Los compuestos identificados como estimuladores de la actividad S1P liasa, directamente en la enzima o indirectamente aumentando el nivel de expresión del gen que codifica la enzima (por ejemplo, mediante activación de genes, potenciación de la estabilidad del ARNm de la S1P liasa, etc.) pueden investigarse más a fondo, puesto que dichos compuestos pueden demostrar ser útiles para disminuir la concentración extracelular de S1P en pacientes en los que los niveles de S1P se correlacionan con toxicidad, tal como en el tratamiento del cáncer, enfermedades cardio- y cerebrovasculares, trastornos autoinmunitarios, trastornos inflamatorios, angiogénesis, enfermedades fibróticas y degeneración macular relacionada con el envejecimiento.
 45
 50

S1P fosfatasa: La S1P fosfatasa (también conocida como SPP fosfohidrolasa) es una enzima de mamífero que cataliza la conversión de S1P en esfingosina (Mandala *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 95:150-155, 1998; Mandala *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 97:7859- 7864, 2000; Mandala, *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 64:143-156, 2001; Brindley *et al.*, *Methods in Enzymology*, 311 :233-244, 1999). Se han aislado, a partir de levaduras, dos S1P
 55

fosfatasa, LBP1 y LBP2 (Mandala *et al.*, J. Biol. Chem., 272:32709- 32714, 1997); documento PCT/UWOI/03879, publicado como WOO1/57057.

Al igual que la S1P liasa, pueden desarrollarse ensayos de ganancia de función para descubrir compuestos que activen la S1P fosfatasa o que aumenten la expresión del gen que la codifica. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos anti-S1P en un formato de ELISA para medir la producción de S1P a partir de SPH añadida en formatos basados en células o *in vitro*. Los compuestos identificados como estimuladores de la actividad S1P fosfatasa, directamente en la enzima o indirectamente aumentando el nivel de expresión del gen que codifica la enzima (por ejemplo, mediante activación de genes, potenciación de la estabilidad del ARNm de la S1P fosfatasa, etc.) pueden investigarse más a fondo, puesto que dichos compuestos pueden demostrar ser útiles para disminuir la concentración extracelular de S1P en pacientes en los que los niveles de S1P se correlacionan con toxicidad, tal como en el tratamiento del cáncer, enfermedades cardio- y cerebrovasculares, trastornos autoinmunitarios, trastornos inflamatorios, angiogénesis, enfermedades fibróticas y degeneración macular relacionada con el envejecimiento.

Ejemplo 9: Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra LPA

Producción de anticuerpos

Aunque se han descrito anticuerpos policlonales contra LPA natural en la bibliografía (Chen J.H., *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 7 de agosto 2000, 10(15):1691-3), no se han descrito anticuerpos monoclonales. Utilizando una estrategia similar a la descrita en el ejemplo 4, se generaron anticuerpos monoclonales anti-LPA utilizando un análogo de tio-LPA C-12 (compuesto 28 en el ejemplo 3) como componente clave de un hapteno formado por el entrecruzamiento del análogo a través del grupo SH reactivo con una proteína portadora (KLH) a través de un entrecruzamiento químico convencional utilizando IOA o SMCC como agente entrecruzador. Para lograr esto, se inmunizaron ratones con el hapteno de tio-LPA-KLH (en este caso, LPA-tiolada:SMCC:KLH) utilizando los métodos descritos en el ejemplo 4 para la generación de anticuerpos monoclonales anti-S1P. De los 80 ratones inmunizados contra el análogo de LPA, se eligieron los cinco animales que mostraron las mayores titulaciones contra LPA (determinadas utilizando un ELISA en el que el mismo análogo de LPA (compuesto 28) utilizado en el hapteno se conjuga con BSA utilizando SMCC y se deposita sobre las placas ELISA) para proseguir hacia la fase de desarrollo del hibridoma.

Se recolectaron los bazos de estos cinco ratones y se generaron hibridomas mediante técnicas convencionales. Brevemente, un ratón produjo líneas celulares de hibridoma (denominadas 504A). De todos los hibridomas cultivados de la serie 504A, 66 mostraron producción positiva de anticuerpos según se mide mediante el ELISA de selección previamente descrito.

La siguiente tabla 3 muestra las titulaciones de anticuerpos en los sobrenadantes celulares de hibridomas creados a partir de los bazos de dos de los ratones que respondieron a un hapteno de análogo de LPA en el que el análogo de LPA tiolado estaba entrecruzado con KLH utilizando agentes entrecruzadores heterobifuncionales. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-LPA no reaccionan con el entrecruzador ni con la proteína portadora. De forma más importante, los datos demuestran que los hibridomas producen anticuerpos contra LPA y no contra S1P.

Tabla 3: Hibridomas de LPA

ratón nº	DO de la titulación del 3er sangrado a 1:312.500	Sobrenadantes de los 24 pocillos	DO de la unión de LPA a 1:20	DO de la unión de S1P a 1:20	Reactividad cruzada con S1P*
1	1,242	1.A.63	1,197	0,231	baja
		1.A.65	1,545	0,176	ninguna
2	0,709	2.B.7	2,357	0,302	baja
		2.B.63	2,302	0,229	baja
		2.B.83	2,712	0,175	ninguna
		2.B.104	2,57	0,164	ninguna
		2.B.1B7	2,387	0,163	ninguna
		2.B.3A6	2,227	0,134	ninguna

*Reactividad cruzada con S1P de sobrenadantes de 24 pocillos:

alta = DO > 1,0-2,0 a [1:20]

media = DO 0,4-1,0 a [1:20]

baja = DO 0,4-0,2 a [1:20]

ninguna = DO < 0,2 a [1:20]

El desarrollo de mAb anti-LPA en ratones se controló mediante un ELISA (unión directa a LPA 12:0 y 18:1 y ELISA competitivo). Se observó una significativa respuesta inmunológica en al menos la mitad de los ratones inmunizados y se seleccionaron cinco ratones con las titulaciones de anticuerpos más altas para iniciar el desarrollo de la línea celular de hibridoma después de la fusión de los bazos.

5 Después de la selección inicial de más de 2000 líneas celulares de hibridoma generados a partir de estas 5 fusiones, un total de 29 líneas celulares de hibridoma que segregan anti-LPA mostraron una alta unión a LPA 18:1. De estas líneas celulares de hibridoma, 24 después se subclonaron y se caracterizaron en un panel de ensayos ELISA. De los 24 clones que seguían siendo positivos se seleccionaron seis clones de hibridomas para una mayor caracterización. Su selección se basó en su mejores propiedades bioquímicas y biológicas.

10 Cinética de unión directa

Se midió la unión de 6 mAb anti-LPA (B3, B7, B58, A63, B3A6, D22) y LPA 12:0 y 18:1 (0,1 μM) mediante ELISA. Se calcularon los valores de CE_{50} a partir de las curvas de titulación utilizando 6 concentraciones crecientes de mAb purificados (de 0 a 0,4 $\mu\text{g/mL}$). La CE_{50} representa la concentración de anticuerpo eficaz con 50% de la unión máxima. Max indica la unión máxima (expresada como DO450). Los resultados se muestran en la tabla 4.

15 Tabla 4: Cinética de unión directa de mAb anti-LPA

		B3	B7	B58	D22	A63	B3A6
LPA 12:0	CE ₅₀ (nM)	1,420	0,413	0,554	1,307	0,280	0,344
	Max (DO450)	1,809	1,395	1,352	0,449	1,269	1,326
LPA 18:1	CE ₅₀ (nM)	1,067	0,274	0,245	0,176	0,298	0,469
	Max (DO450)	1,264	0,973	0,847	0,353	1,302	1,027

20 Se determinaron los parámetros cinéticos k_a (constante de velocidad de asociación), k_d (constante de velocidad de disociación) y K_D (constante de equilibrio de asociación) para los 6 candidatos principales utilizando una máquina BIAcore 3000 Biosensor. En este estudio, el LPA se inmovilizó sobre la superficie del detector y los mAb anti-LPA se hicieron fluir en disolución sobre la superficie. Tal como se muestra, los seis mAb se unen a LPA con unos valores de K_D similares que varían de 0,34 a 3,8 μM y tienen parámetros cinéticos similares.

Los mAb murinos anti-LPA muestran alta afinidad por LPA

25 El LPA se inmovilizó al chip detector a unas densidades que recorren 150 unidades de resonancia. Se hicieron pasar diluciones de cada mAb sobre el LPA inmovilizado y se obtuvieron las constantes cinéticas mediante una regresión no lineal de fases de asociación/disociación. Los errores se muestran como la desviación estándar utilizando al menos tres determinaciones en ensayos por duplicado. Se determinaron las afinidades aparentes mediante $K_D = k_d/k_a$. k_a = constante de velocidad de asociación en $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. k_d = constante de velocidad de disociación en s^{-1} .

Tabla 5: Afinidad del mAb anti-LPA por LPA

mAb	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)
A63	4,4 \pm 1,0 $\times 10^5$	1 $\times 10^{-6}$	2,3 \pm 0,5
B3	7,0 \pm 1,5 $\times 10^5$	1 $\times 10^{-6}$	1,4 \pm 0,3
B7	6,2 \pm 0,1 $\times 10^5$	1 $\times 10^{-6}$	1,6 \pm 0,1
D22	3,0 \pm 0,9 $\times 10^4$	1 $\times 10^{-6}$	33 \pm 10
B3A6	1,2 \pm 0,9 $\times 10^6$	1,9 \pm 0,4 $\times 10^{-5}$	16 \pm 1,2

30 Perfil de especificidad de seis mAb anti-LPA

35 Se han identificado muchas isoformas de LPA que son biológicamente activas y resulta preferible que el mAb las reconozca todas en algún grado para que tenga importancia terapéutica. La especificidad de los mAb anti-LPA se evaluó utilizando un ensayo de competición en el que se añadió el lípido competidor a la mezcla de anticuerpo-lípido inmovilizado. Se realizaron ensayos de ELISA competitivos con 6 mAb para evaluar su especificidad. El LPA 18:1 se capturó sobre placas de ELISA. Cada lípido competidor (hasta 10 μm) se diluyó en serie en BSA (1 mg/mL)-PBS y

después se incubó con los mAb (3 nM). Las mezclas después se trasladaron a pocillos revestidos con LPA y se midió la cantidad de anticuerpo unido con un anticuerpo secundario. Los datos se normalizaron para una señal máxima (A_{450}) y se expresan como porcentaje de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado. CI_{50} : concentración de inhibición semimáxima; MI: inhibición máxima (% de unión en ausencia de inhibidor); -: no se calcula debido a una inhibición débil. Un resultado de inhibición alto indica el reconocimiento del lípido competidor por el anticuerpo. Tal como se muestra en la tabla 6, todos los mAb anti-LPA reconocen las diferentes isoformas de LPA.

Tabla 6: Perfil de especificidad de seis mAb anti-LPA

	LPA 14:0		LPA 16:0		LPA 18:1		LPA 18:2		LPA 20:4	
	CI_{50}	MI	CI_{50}	MI	CI_{50}	MI	CI_{50}	MI	CI_{50}	MI
	μM	%	μM	%	μM	%	μM	%	μM	%
504B3	0,02	72,3	0,05	70,3	0,287	83	0,064	72,5	0,02	67,1
504B7	0,105	61,3	0,483	62,9	>2,0	100	1,487	100	0,161	67
504B58-3F8	0,26	63,9	5,698	>100	1,5	79,3	1,240	92,6	0,304	79,8
504B104	0,32	23,1	1,557	26,5	28,648	>100	1,591	36	0,32	20,1
504D22-1	0,164	34,9	0,543	31	1,489	47,7	0,331	31,4	0,164	29,5
504A63-1	1,147	31,9	5,994	45,7	-	-	-	-	0,119	14,5
50483A6-1	0,108	59,9	1,151	81,1	1,897	87,6	-	-	0,131	44,9

De modo interesante, los mAb anti-LPA fueron capaces de discriminar entre LPA 12:0 (lauroilo), 14:0 (miristoilo), 16:0 (palmitoilo), 18:1 (oleoilo), 18:2 (linoleoilo) y 20:4 (araquidonóilo). El orden de clasificación para CE_{50} fue para los lípidos insaturados 18:2 > 18:1 > 20:4 y para los lípidos saturados 14:0 > 16:0 > 18:0. Son deseables mAb con una alta especificidad para su utilización en último término para el desarrollo de fármacos. La especificidad de los mAb anti-LPA se evaluó para su unión a biolípidos relacionados con LPA, tales como ácido diestearoilfosfatídico, lisofosfatidilcolina, S1P, ceramida y ceramida-1-fosfato. Ninguno de los seis anticuerpos mostró reactividad cruzada con diestearoil-Pa y LPC, el precursor metabólico inmediato de LPA.

Ejemplo 10: Actividades anticáncer de anticuerpos monoclonales anti-LPA

Proliferación de células cancerosas

El LPA es un potente factor del crecimiento que apoya la supervivencia y la proliferación celular mediante la estimulación de G_i , G_q y $G_{12/13}$ a través de receptores de GPCR y la activación de acontecimientos de señalización corriente abajo. Se ensayaron líneas celulares para su respuesta proliferativa a LPA (de 0,01 mM a 10 mM). La proliferación celular se ensayó utilizando el kit de ensayo de proliferación celular de Chemicon (Temecula, CA) (Panc-1) y la titulación Cell-Blue de Pierce (Caki-1). Cada valor de los datos es la media de tres experimentos independientes. El LPA aumenta la proliferación de 7 líneas de células tumorales derivadas de ser humano de una manera dependiente de la dosis, que incluyen células SKOV3 y OVCAR3 (cáncer de ovario), Panc-1 (cáncer pancreático), Caki-1 (células de carcinoma renal), DU-145 (cáncer de próstata), A549 (carcinoma de pulmón) y HCT-116 (adenocarcinoma colorrectal) y una línea de células tumorales derivada de rata, RBL-2H3 (células de leucemia de rata). Aunque las células derivadas de tumores normalmente tienen unos altos niveles basales de proliferación, el LPA parece aumentar aún más la proliferación en la mayoría de las líneas de células tumorales. Se evaluaron mAb anti-LPA (B7 y B58) para la capacidad para inhibir la proliferación inducida por LPA en líneas celulares de cáncer humanas seleccionadas. Se demostró que el aumento en la proliferación inducido por el LPA es mitigado por la adición de mAb anti-LPA.

El mAb anti-LPA sensibiliza a las células tumorales frente a agentes quimioterapéuticos

Se investigó la capacidad del LPA para proteger a las células de un tumor ovárico frente a la apoptosis cuando se exponen a niveles clínicamente pertinentes del agente quimioterapéutico paclitaxel (taxol). Células SKVO3 se trataron con FBS al 1% (S), taxol (0,5 mM) +/- mAb anti-LPA durante 24 h. El LPA protegió a las células SKVO3 frente a la apoptosis inducida por taxol. La apoptosis se ensayó midiendo la actividad caspasa según recomienda el fabricante (Promega). Tal como se anticipó, el LPA protegió a la mayoría de las líneas celulares de cáncer ensayadas frente a la muerte celular inducida por taxol. Cuando se añade anticuerpo anti-LPA a una selección de células que responden a LPA, el anticuerpo anti-LPA bloquea la capacidad del LPA para proteger a las células de la muerte inducida por el agente quimioterapéutico citotóxico. Además, el anticuerpo anti-LPA es capaz de eliminar la

protección proporcionada por el suero. Se calcula que el suero contiene LPA aproximadamente 5-20 mM. La activación de caspasa-3,7 inducida por taxol en células SKOV3 y la adición de suero a las células protege a las células frente a la apoptosis. La activación de la caspasa inducida por taxol fue potenciada por la adición de los 3 mAb anti-LPA al medio de cultivo. Esto sugiere que los efectos protectores y antiapoptóticos del LPA fueron eliminados mediante la neutralización mediada por anticuerpos selectivos del LPA presente en el suero.

El mAb anti-LPA inhibe la migración mediada por LPA de células tumorales

Una característica importante de los cánceres metastásicos es que las células tumorales escapan a la inhibición por contacto y migran a sitios lejanos de su tejido de origen. Se ha demostrado que el LPA estimula el potencial metastásico en varios tipos de células cancerosas. Por consiguiente, los inventores ensayaron la capacidad de mAb anti-LPA para bloquear la migración celular dependiente de LPA en varias líneas celulares de cáncer humanas utilizando el ensayo del cierre de herida en una monocapa celular. Las células se siembran en placas de 96 pocillos y se cultivan hasta la confluencia. Después de 24 h de ayuno, en el centro de los pocillos se realiza una herida en la monocapa con la punta de una pipeta. En este ensayo aceptado por la técnica ("scratch assay"), las células responden a la herida en la monocapa celular de un modo estereotipado migrando hacia la herida y cerrando la herida. El avance de la migración y el cierre de la herida se controla mediante fotografía digital con un aumento 10x en momentos deseados. Las células no se trataron (NT), se trataron con LPA (2,5 mM) con o sin mAb B7 (10 mg/mL) o un isotipo que se corresponde con un anticuerpo no específico (NS) (10 mg/mL). En las células no tratadas, una gran brecha permanece entre los márgenes de la monocapa después de haber realizado la herida. Por contraste, las células tratadas con LPA sólo presentan una pequeña brecha en ese mismo momento y unas pocas células están estableciendo contacto a través de la brecha. En células tratadas con LPA y el anticuerpo anti-LPA B7, la brecha en este momento es varias veces mayor que en el tratamiento sólo con LPA, aunque no es tan grande como en las células control sin tratar. Esto demuestra que el anticuerpo anti-LPA tiene un efecto inhibitorio sobre la migración estimulada por LPA de células de carcinoma de células renales (Caki-1). Se obtuvieron datos similares con los mAb B3 y B58. Esto indica que el mAb anti-LPA puede reducir la migración mediada por LPA de líneas celulares producidas originariamente a partir de carcinomas metastásicos.

Los mAb anti-LPA inhiben la liberación de citoquinas protumorigénicas desde células tumorales

El LPA está implicado en el establecimiento y el avance del cáncer proporcionando un microentorno que favorece el crecimiento del tumor y estimulando la angiogénesis. En particular, se han observado un aumento en los factores que favorecen el crecimiento, tales como IL-8 y VEGF, en células cancerosas. La IL-8 está muy implicada en el avance y la prognosis del cáncer. La IL-8 puede ejercer su efecto en el cáncer a través de la estimulación de la neovascularización y la inducción de la quimiotaxis de neutrófilos y células endoteliales. Además, la sobreexpresión de IL-8 se ha correlacionado con el desarrollo de un fenotipo resistente a fármacos en muchos tipos de cánceres humanos.

Se ensayaron tres mAb anti-LPA (B3, B7 y B58) para sus capacidades para reducir la producción de IL-8 *in vitro* comparado con un anticuerpo no específico (NS). Se sembraron células Caki-1 en placas de 96 pocillos y se cultivaron hasta la confluencia. Después de un ayuno de suero durante la noche, las células se trataron con LPA 18:1 (0,2 mM), con o sin los mAb anti-LPA B3, B7, B58 o NS (no específico). Después de 24 h, los sobrenadantes cultivados de células de cáncer renal (Caki-1), tratadas con o sin LPA y en presencia de concentraciones crecientes de los mAb anti-LPA B3, B7 y B58 se recolectaron y se analizaron para los niveles de IL-8 utilizando un kit ELISA disponible en el mercado (Human Quantikine Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN). En las células pretratadas con los mAb anti-LPA, la expresión de IL-8 se redujo significativamente de una manera dependiente de la dosis (de 0,1-30 mg/mL de mAb), mientras que LPA aumenta la expresión de IL-8 en una media del 100% en células no tratadas. Se obtuvieron resultados similares con otro factor proangiogénico muy conocido, VEGF. También se observó la inhibición de la liberación de IL-8 por los mAb anti-LPA en otras líneas de células cancerosas, tales como la línea celular pancreática Panc-1. Estos datos sugieren que el bloqueo de la liberación de factores proangiogénicos es un efecto adicional y potencialmente importante de estos mAb anti-LPA.

Los mAb anti-LPA inhiben la angiogénesis *in vivo*

Uno de los mAb anti-LPA (B7) se ensayó para su capacidad para mitigar la angiogénesis *in vivo* utilizando el ensayo de lecho corto de Matrigel. Este ensayo utiliza Matrigel, una mezcla patentada de remanentes tumorales que incluyen membranas basales derivadas de tumores murinos. Cuando Matrigel, o su derivado con menos factores del crecimiento (Matrigel GFR), se inyecta por vía subcutánea en un animal, se solidifica y forma un "lecho corto". Si se mezclan factores proangiogénicos con la matriz antes de su colocación, el lecho corto será invadido por células endoteliales vasculares que acaban formando vasos sanguíneos. El Matrigel puede prepararse solo o mezclado con factores del crecimiento recombinantes (bFGF, VEGF) o células tumorales y después inyectarse por vía subcutánea en los flancos de ratones hembra atímicos (NCr Nu/Nu) de 6 semanas. En este ejemplo, se introdujeron células Caki-1 (carcinoma renal) dentro del Matrigel y que producen suficientes niveles de VEGF y/o IL-8 y LPA. Se preparan lechos cortos de Matrigel que contienen 5×10^5 células Caki-1 de ratones tratados con disolución salina o con 10 mg/kg de mAb anti-LPA B7, cada 3 días comenzando el día 1 antes de la implantación del Matrigel. Los lechos cortos se tiñen para CD31 endotelial, seguido de la cuantificación de la microvasculatura formada en los lechos cortos. Los datos de cuantificación son la media +/- MEE de al menos 16 campos/sección de 3 lechos cortos.

Los lechos cortos de ratones tratados con el mAb anti-LPA B7 muestran una reducción destacada en la formación de vasos sanguíneos, según se ensaya mediante tinción endotelial para CD31, comparado con los lechos cortos de ratones tratados con disolución salina. La cuantificación de los vasos teñidos demuestra una reducción mayor que 50% en la angiogénesis en lechos cortos que contienen Caki-1 procedentes de animales tratados con mAb B7, comparado con los animales tratados con disolución salina. Esto resultó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$ para mAb B7 frente a disolución salina, según se determina mediante el ensayo de la *t* de Student) en la angiogénesis de células tumorales como resultado del tratamiento con mAb anti-LPA.

Los mAb anti-LPA reducen el avance del tumor en xenoinjertos renales y pancreáticos

Los anticuerpos anti-LPA han demostrado (ver anteriormente) ser eficaces para reducir la proliferación de células tumorales inducida por LPA, la migración, la protección frente a la muerte celular y la liberación de citoquinas en múltiples líneas celulares tumorales. Los mAb B58 y B7 después se ensayaron en un modelo de xenoinjerto de cáncer renal y pancreático. A continuación se exponen los resultados preliminares que demuestran los potenciales efectos antitumorogénicos de la estrategia de anticuerpos anti-LPA.

Se desarrollaron tumores mediante la inyección subcutánea de células de tumores humanos Caki-1 y Panc-1 en el flanco izquierdo de ratones atímicos (NCR Nu/Nu) hembra de 4 semanas utilizando protocolos convencionales. Después de 10 días para Caki-1 y 30 días para Panc-1, cuando se habían formado tumores sólidos (aproximadamente 200 mm³), los animales se clasificaron aleatoriamente en grupos de tratamiento. El tratamiento se inició mediante la administración intraperitoneal de 25 mg/kg de los mAb anti-LPA o de portador (disolución salina). Los anticuerpos se administraron cada tres días durante la duración del estudio. Los tratamientos consistieron en 25 mg/kg de mAb anti-LPA B58 para los tumores Caki-1 y de mAb B7 para Panc-1 o disolución salina. Los datos son la media \pm MEE de 7 ratones tratados con disolución salina y 6 ratones tratados con B58 para el estudio de Caki-1 y 4 ratones tratados con disolución salina y 5 tratados con B7 para el estudio de Panc-1. Se midieron los volúmenes tumorales en días alternos utilizando calibradores electrónicos y se determinó el volumen tumoral mediante la fórmula $P^2 \times L/2$. Después los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 1500 mm³ en el grupo de disolución salina. Se registraron los pesos y los volúmenes tumorales finales.

En este experimento preliminar, la capacidad de los mAb anti-LPA para reducir el volumen tumoral fue evidente después de que los tumores alcanzasen aproximadamente 400-500 mm³. En este momento, los tumores de los animales control continuaron creciendo, mientras que los tumores de los animales tratados con mAb anti-LPA mostraron una velocidad de crecimiento más lenta en ambos modelos de xenoinjerto. Los datos demuestran que el mAb anti-LPA también reduce el peso final de los tumores de Caki-1 y Panc-1 cuando se compara con los pesos de los tumores de los animales tratados con disolución salina.

Los mAb anti-LPA modulan los niveles de citoquinas proangiogénicas en la circulación en animales con tumores

Los mAb anti-LPA (B58 y B7) también influyen en los niveles de citoquinas proangiogénicas en la circulación. En animales tratados con el mAb anti-LPA (Panc-1), el nivel sérico de interleuquina-8 (IL-8) no fue detectable en ninguno de los animales tratados con anticuerpos, mientras que sí fueron detectables los niveles séricos de IL-8 en los xenoinjertos de Panc-1 y Caki-1 después de 85 y 35 días, respectivamente. De forma más importante, existe una fuerte correlación ($r = 0,98$) entre el tamaño del tumor y los niveles de IL-8. En los animales que portan tumores Caki-1, los niveles séricos de IL-8 humana también se redujeron por el tratamiento con mAb B58 anti-LPA ($r = 0,34$), cuando se compara con el tratamiento con disolución salina ($r = 0,55$). Tal como se mencionó anteriormente, se cree que la reducción de los niveles de citoquinas en la circulación es debida a una inhibición directa de la liberación de citoquinas desde las propias células tumorales. Los datos demuestran la capacidad del mAb anti-LPA para reducir el avance del tumor, mientras que también reducen los niveles de compuestos proangiogénicos en la circulación.

Los mAb anti-LPA reducen el avance del tumor en un modelo murino de metástasis

Una característica importante del avance del tumor es la capacidad de un tumor para metastatizar y formar nódulos tumorales secundarios en sitios remotos. Los estudios *in vitro* descritos en la presente anteriormente han demostrado la capacidad de LPA para inducir a las células tumorales para evitar la inhibición por contacto y estimular la migración en un ensayo de cierre de herida para la movilidad celular. En estos estudios, los mAb anti-LPA también inhiben a los efectores estimulantes del crecimiento tumoral de LPA. Se ensayó la eficacia del mAb anti-LPA para inhibir la metástasis tumoral *in vivo*. El fenómeno de la metástasis tumoral ha sido difícil de imitar en modelos animales. Muchos investigadores utilizan un modelo de metástasis "experimental" en el que las células tumorales se inyectan directamente en la corriente sanguínea.

La formación de vasos sanguíneos es un proceso integral de metástasis, porque un aumento en el número de vasos sanguíneos significa que las células tienen que recorrer una distancia más corta para alcanzar la circulación. Se cree que el mAb anti-LPA inhibiría la metástasis de células tumorales *in vivo*, basándose en el descubrimiento de que el mAb anti-LPA puede bloquear varias etapas integrales en el proceso metastático.

El estudio fue el siguiente. Se empleó un melanoma murino altamente metastático (B16-F10) para estudiar el efecto terapéutico de tres mAb anti-LPA sobre la metástasis *in vivo*. Este modelo ha demostrado ser muy sensible a los

inhibidores de cPA de autotaxina. Ratonas hembra de 4 semanas (C57BL/6) recibieron una inyección de células tumorales de melanoma murino B16-F10 (100 μ l de 5×10^4 células/animales) a través de la vena de la cola. A los ratones (10 por grupo) se les administraron 25 mg/kg del mAb anti-LPA (B3 o B7) o disolución salina cada tres días mediante una inyección intraperitoneal. Después de 18 días, los pulmones se recolectaron y se analizaron. Los órganos pulmonares son el sitio metastásico preferido de las células de melanoma y por tanto se evaluaron cuidadosamente para la observación de nódulos metastásicos. Los pulmones se inflaron con formaldehído tamponado al 10% a través de la tráquea, para inflar y fijar simultáneamente, de modo que pudiesen detectarse incluso los focos pequeños tras un examen histológico. Los pulmones se separaron en cinco lóbulos y los tumores se clasificaron según su dimensión (grandes ≥ 5 mm; medianos 1-4 mm; pequeños < 1 mm) y se contaron bajo un microscopio de disección. Tras estudiar los pulmones, el número de tumores era claramente menor en los animales tratados con anticuerpos. Para los animales tratados con el mAb B3, los tumores grandes se redujeron en 21%, los tumores medios en 17% y, los tumores pequeños en 22%. Un análisis estadístico mediante un ensayo t de Student produjo un $p < 0,05$ para el número de tumores pequeños en animales tratados con mAb B3 frente a la disolución salina.

Tal como se muestra en los anteriores ejemplos, se ha demostrado que los efectos tumorigénicos de LPA se extienden a líneas celulares de carcinoma renal (por ejemplo, Caki-1) y de carcinoma pancreático (Panc-1). El LPA induce la proliferación de células tumorales, la migración y la liberación de agentes proangiogénicos y/o prometastásicos, tales como VEGF e IL-8, en ambas líneas celulares. Se ha demostrado que tres anticuerpos anti-LPA monoclonales específicos de alta afinidad muestran eficacia en un panel de ensayos celulares *in vitro* y modelos de tumores *in vivo* de angiogénesis y metástasis.

Ejemplo 11: Inmunohistoquímica de material de biopsia tumoral

El objetivo de este ejemplo es demostrar que los mAb desarrollados contra S1P pueden utilizarse para detectar S1P en material de biopsia. Este método inmunohistoquímico (IHC) evalúa el nivel de la S1P en el tumor (que se cree que es producida por el propio tumor) y puede ser más sensible y específico que medir la expresión de proteínas o ARN de esfingosina quinasa. Además, el método IHC no sufre disminución de la señal de S1P, puesto que la S1P segregada del tumor es diluida en el espacio extracelular (por ejemplo, compartimento plasmático). Los inventores analizaron el contenido en S1P en secciones de tumor humano U937 (congeladas, espesor de 10 mm) procedentes de un modelo de Matrigel/xenoinjerto de ratón. Las células U937 (línea celular de linfoma humano; ATCC n° de catálogo CRL-1593.2) se mezclaron con la matriz de Matrigel a una concentración de 10,5 mg/mL. Se implantaron 600 μ l de mezcla de Matrigel que contenía U937 (30×10^6 células/lecho corto en un volumen de 600 μ l) en el flanco derecho de ratones hembra nu/nu de 4-6 semanas y se dejaron crecer durante 30 días. Los animales se sacrificaron y se extirparon los lechos cortos de Matrigel y se introdujeron en OTC y se congelaron de forma instantánea en hielo seco e isopentano. Después se cortaron utilizando un criostato en secciones de 5 μ m. Las secciones después se fijaron en formaldehído tamponado neutro al 10% (Sigma, St. Louis, MO, n° de catálogo HT 50-1-1, n° de lote 025K4353) durante 20 min a temperatura ambiente y después se seccionaron. Las secciones se lavaron con glicina 100 mM (pH 7,4) en PBS durante 5 min a temperatura ambiente, se lavaron 2x con PBS/Tween 20 al 0,1%. Las secciones se bloquearon en BSA al 1%/PBS/Tween al 0,05% durante 20 min a temperatura ambiente. Se diluyeron los anticuerpos primarios (por ejemplo, mAb anti-S1P murinos) (1:25 o 1:50, según se indica) en BSA al 1%/PBS/Tween al 0,05% y se incubaron con secciones de tumor durante 3 h a temperatura ambiente. Después las secciones se lavaron 3x con PBS/Tween al 0,1% con agitación suave. Se incubaron anticuerpos secundarios diluidos (Ab anti-ratón conjugado con FITC (1:250) y Ab anti-rata conjugado con RRx (1:2500 o 1:500) en BSA al 1%/PBS/Tween al 0,05% con secciones de tumores durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones entonces se lavaron 6x a intervalos de 5 min con PBS/Tween al 0,05%. Las secciones se contratiñeron con DAPI (dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 10 mg, Sigma, St. Louis, MO, n° de catálogo D3571, lote 22775)) mediante incubación con DAPI (1:5000) diluido en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Después las secciones se lavaron 2x a intervalos de 5 min con PBS y 1x con H₂O DI y se montaron en medio de montaje Gelvitol y se dejaron secar. Los anticuerpos primarios utilizados fueron mAb anti-S1P LT1002 (LH-2, 15 mg/mL) diluidos hasta 1,0 mg/mL y se añadieron a una concentración de trabajo de 1:25 en BSA al 1%/PBS/Tween al 0,05%. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Ab de IgG anti-ratón (H+L) de conejo conjugado con fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, n° catálogo 315-095-003, n° de lote 67031) diluido 1:250 en BSA al 1%/PBS/Tween al 0,05%. Se capturaron imágenes con un sistema de microscopio de deconvolución DeltaVision (Applied Precision Inc., Issaquah, WA). El sistema incluye un CCD Photometrics montado sobre un microscopio de epifluorescencia invertido Nikon TE-200. En general, se tomaron 8-10 secciones ópticas separadas por aproximadamente 0,2 μ m. Los tiempos de exposición se ajustaron de modo que la respuesta de la cámara se encontrase en el intervalo lineal para cada fluoróforo. Las lentes incluían 20x y 10x. Los conjuntos de datos se deconvolucionaron y se analizaron utilizando el programa informático SoftWork (Applied Precision, Inc.) en una estación de trabajo Silicon Graphics Octane.

La S1P puede observarse con facilidad en las imágenes de biopsia tumoral utilizando este método IHC, empleando el mAb anti-S1P como anticuerpo primario. Por contraste, no apareció tinción de S1P en las muestras control de las cuales se omitió el anticuerpo primario.

Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría ni a estos ejemplos, se cree que la medición del biomarcador S1P puede utilizarse junto con mediciones de la expresión génica de receptores de S1P y de esfingosina quinasa,

pudiendo ambos actuar como marcadores sustitutos del cáncer. Los ejemplos de métodos de análisis de expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices de ADN o micromatrices (Brazma y Vilo, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 17-24; Celis, *et al.*, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, *et al.*, *Drug Discov. Today*, 2000, 5, 415-425), READS (amplificación con enzimas de restricción de ADNc digeridos) (Prashar y Weissman, *Methods Enzymol.*, 1999, 303, 258-272), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 1976-1981), matrices de proteínas y proteómica (Celis, *et al.*, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Jungblut, *et al.*, *Electrophoresis*, 1999, 20, 2100-2110), secuenciación de marcadores de secuencia expresados (EST) (Celis, *et al.*, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Larsson, *et al.*, *J. Biotechnol.*, 2000, 80, 143-157), huella genética de sustracción de ARN (SuRF) (Fuchs, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 2000, 286, 91-98; Larson, *et al.*, *Cytometry*, 2000, 41, 203-208), clonación de sustracción de presentación diferencial (DD) (Jurecic y Belmont, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 3, 316-321), hibridación genómica comparativa (Carulli, *et al.*, *J. Cell Biochem. Suppl.*, 1998, 31, 286-296), técnicas de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) (Going y Gusterson, *Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 1895-1904) y métodos de espectrometría de masas (To, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2000, 3, 235-241).

REIVINDICACIONES

- 1.- Un reactivo de diagnóstico, que comprende un soporte sólido y un lípido bioactivo derivatizado asociado a él, en el que el lípido bioactivo derivatizado comprende un grupo de cabeza polar y al menos una cadena hidrocarbonada, en el que un átomo de carbon dentro de la al menos una cadena hidrocarbonada está derivatizado con un grupo sulfhidrilo colgante y en el que el lípido bioactivo se selecciona del grupo que consiste en un esfingolípido, un metabolito de esfingolípido, un ácido lisofosfatídico y un precursor del ácido lisofosfatídico, en el que el esfingolípido y el metabolito de esfingolípido se seleccionan del grupo que consiste en ceramida, ceramida-1-fosfato, N-acetilceramida-1-fosfato, esfinganina, esfingosilfosforilcolina (SPC), dihidroesfingosina, dihidroesfingosina-1-fosfato, y esfingosina-1-fosfato (S1P), en el que el lípido bioactivo está asociado con el soporte sólido a través del grupo sulfhidrilo.
- 2.- El reactivo de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que el lípido bioactivo derivatizado está unido directa o indirectamente al soporte sólido.
- 3.- El reactivo de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que el lípido bioactivo derivatizado está unido covalentemente directamente al soporte sólido.
- 4.- El reactivo de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que el lípido bioactivo derivatizado está conjugado con un resto portador, en el que dicho resto portador está unido al soporte sólido.
- 5.- El reactivo de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que el esfingolípido es esfingosina-1-fosfato.
- 6.- El reactivo de diagnóstico según la reivindicación 4, en el que el resto portador se selecciona del grupo que consiste en una proteína, polietilenglicol, oro coloidal, adyuvantes y esferas de silicona.
- 7.- El reactivo de diagnóstico según la reivindicación 4, en el que el resto portador es una proteína, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste en hemocianina de lapa (KLH), albúmina, hemaglutinina, toxoide del tétanos y toxoide de la difteria.
- 8.- El reactivo de diagnóstico según la reivindicación 5, en el que el reactivo de diagnóstico es un derivado de sulfhidrilo de esfingosina-1-fosfato unido covalentemente a hemocianina de lapa (KLH) o albúmina.
- 9.- El reactivo de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que el reactivo de diagnóstico es un derivado de sulfhidrilo del ácido lisofosfatídico unido covalentemente a hemocianina de lapa (KLH) o albúmina.
- 10.- Un método para detectar en una muestra un resto inmunoderivado que se une a un lípido bioactivo seleccionado, que comprende poner en contacto una muestra con un dispositivo de diagnóstico que porta un reactivo de diagnóstico según la reivindicación 1, bajo condiciones que permiten que el resto inmunoderivado, si está presente, se una al lípido bioactivo derivatizado del reactivo de diagnóstico, en el que el lípido bioactivo que está derivatizado en el reactivo de diagnóstico y el lípido bioactivo seleccionado son el mismo lípido bioactivo.
- 11.- El método según la reivindicación 10, en el que el resto inmunoderivado se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo quimérico; un fragmento de un anticuerpo policlonal, monoclonal o quimérico; un variante de un anticuerpo policlonal, monoclonal o quimérico; un derivado de un anticuerpo policlonal, monoclonal o quimérico; y un autoanticuerpo.
- 12.- El método según la reivindicación 10, en el que el lípido bioactivo derivatizado está unido al soporte sólido.
- 13.- El método según la reivindicación 10, en el que el lípido bioactivo derivatizado está conjugado con un resto portador.
- 14.- El método según la reivindicación 13, en el que el resto portador está unido al soporte sólido.
- 15.- El método según la reivindicación 10, en el que la muestra se deriva de un animal.
- 16.- El método según la reivindicación 15, en el que el animal es un ser humano.
- 17.- El método según la reivindicación 15, en el que la muestra es un fluido corporal o una muestra de tejido.

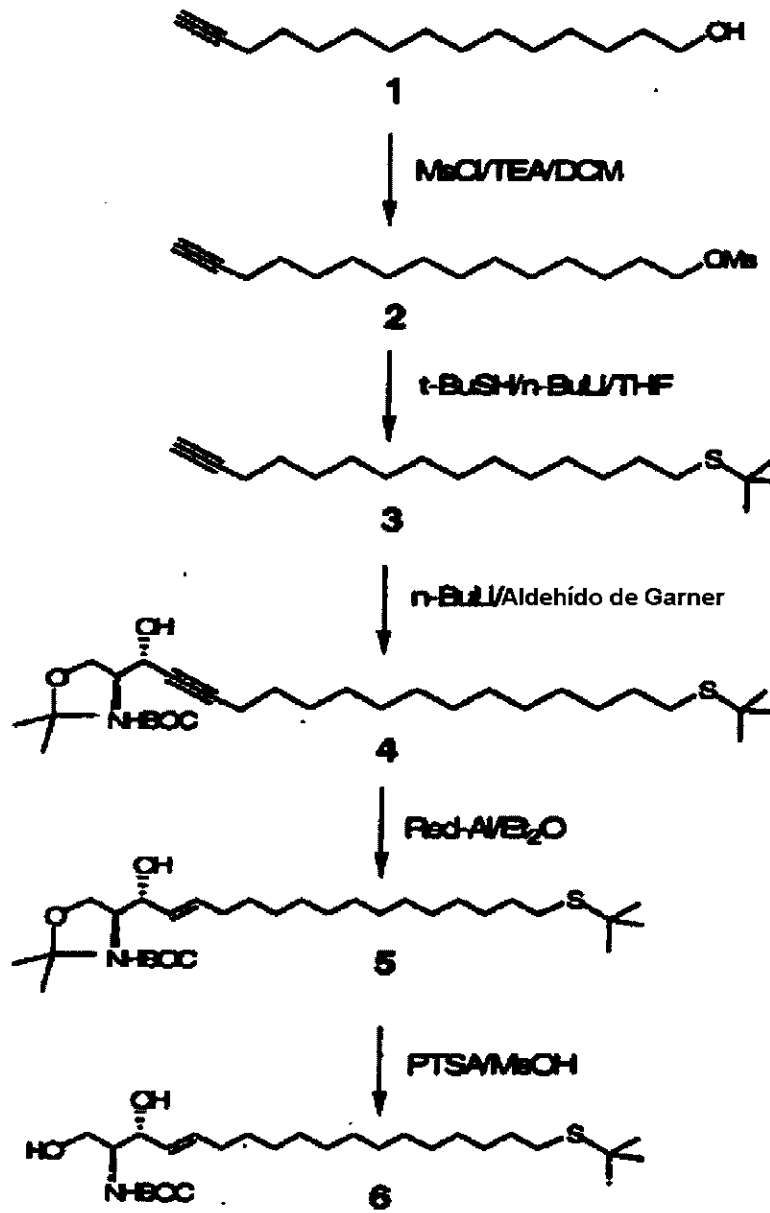


Figura 1a. Síntesis de un antígeno relacionado con S1P tiolada típico

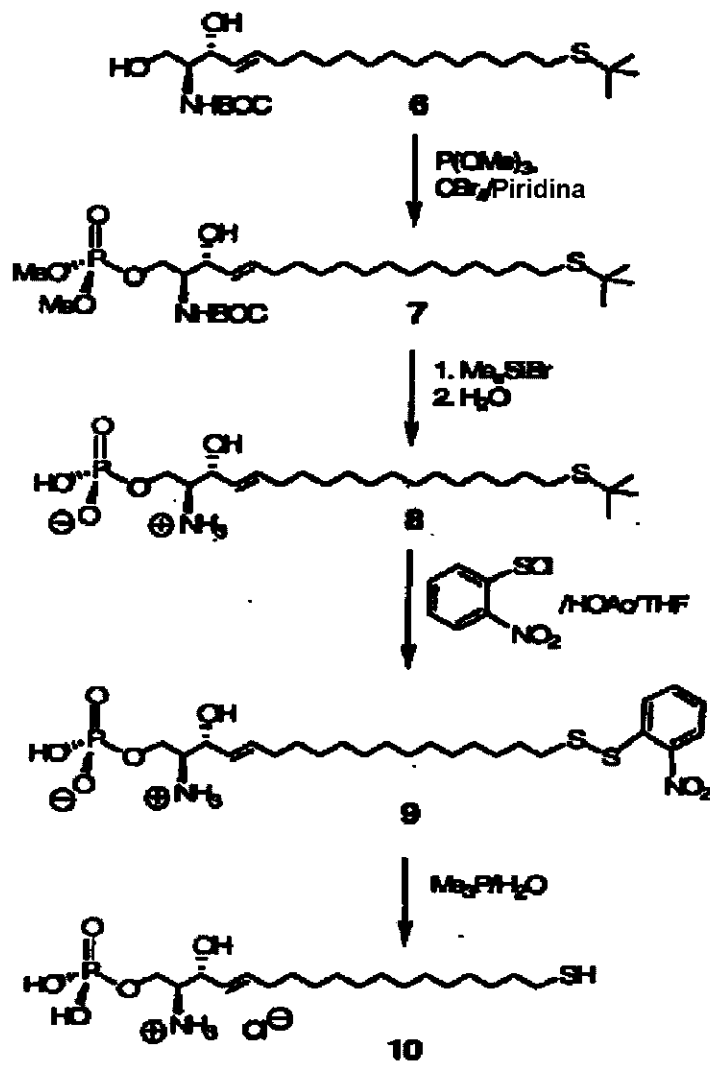


Figura 1b. Síntesis de un antígeno relacionado con S1P tiolada típico (continuación)

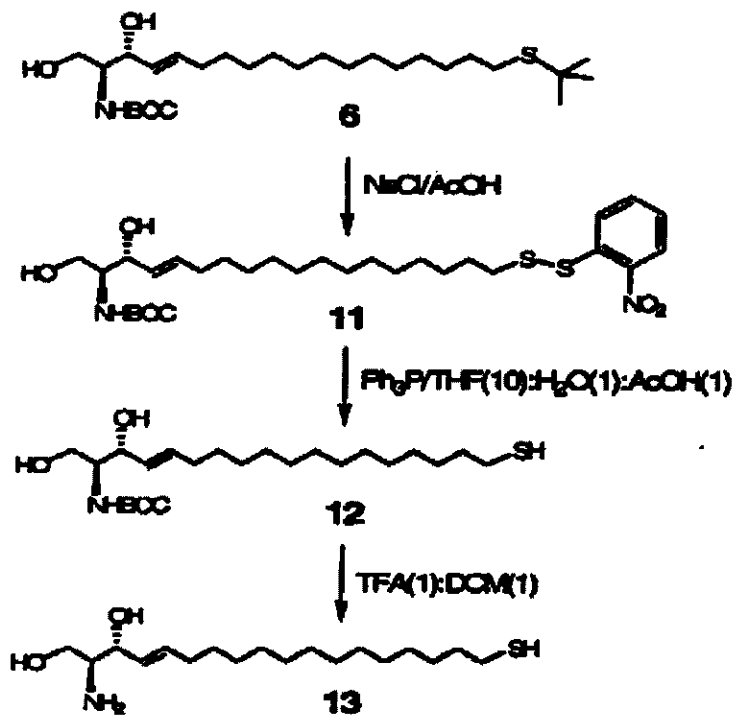


Figura 1c. Síntesis de un antígeno relacionado con S1P tiolada típico (continuación)

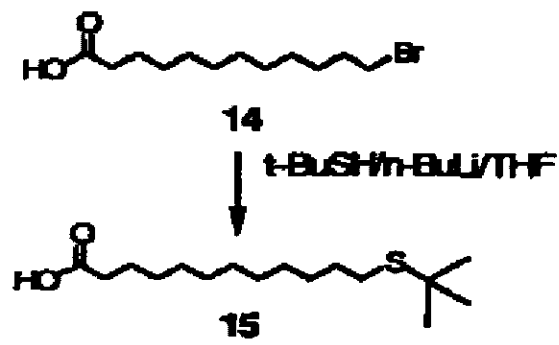


Figura 2a. Síntesis de un ácido graso tiolado protegido típico

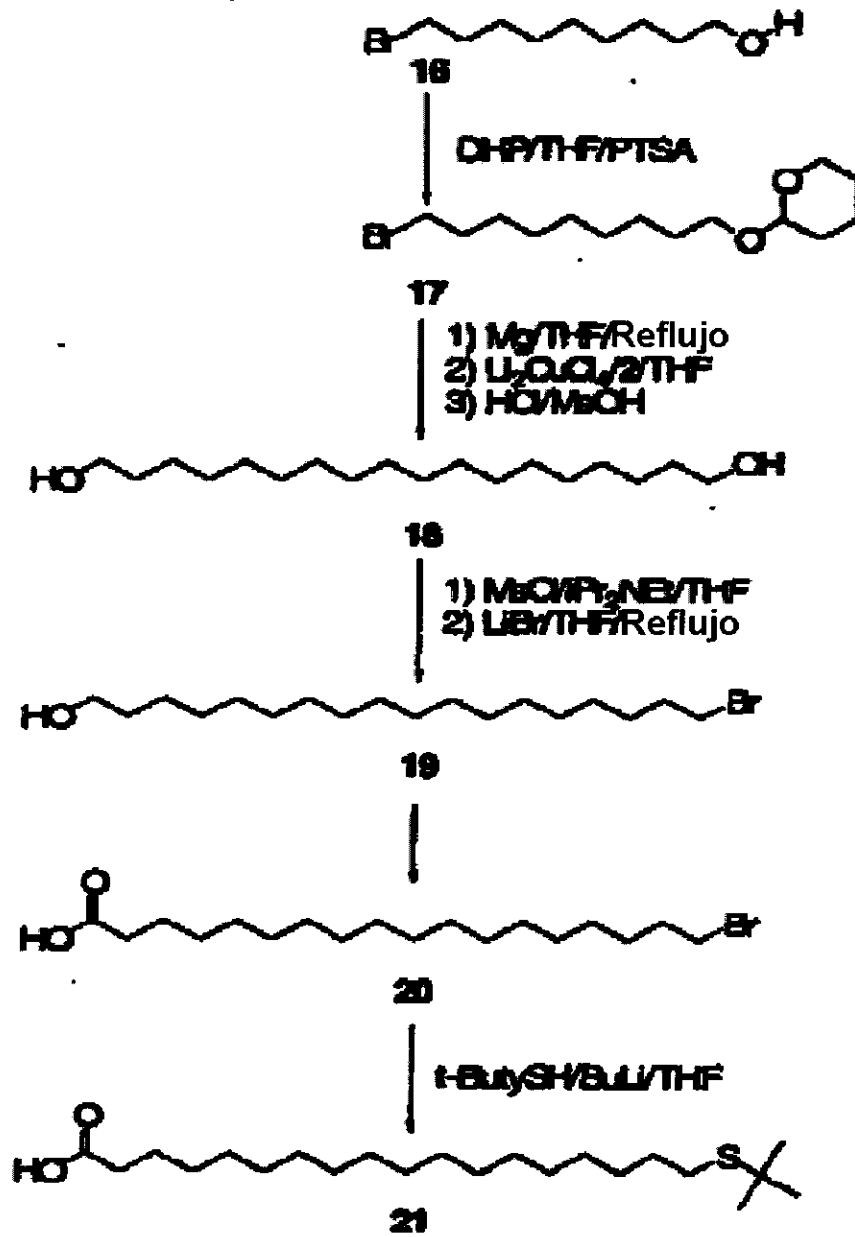


Figura 2b. Síntesis de un ácido graso tiolado típico

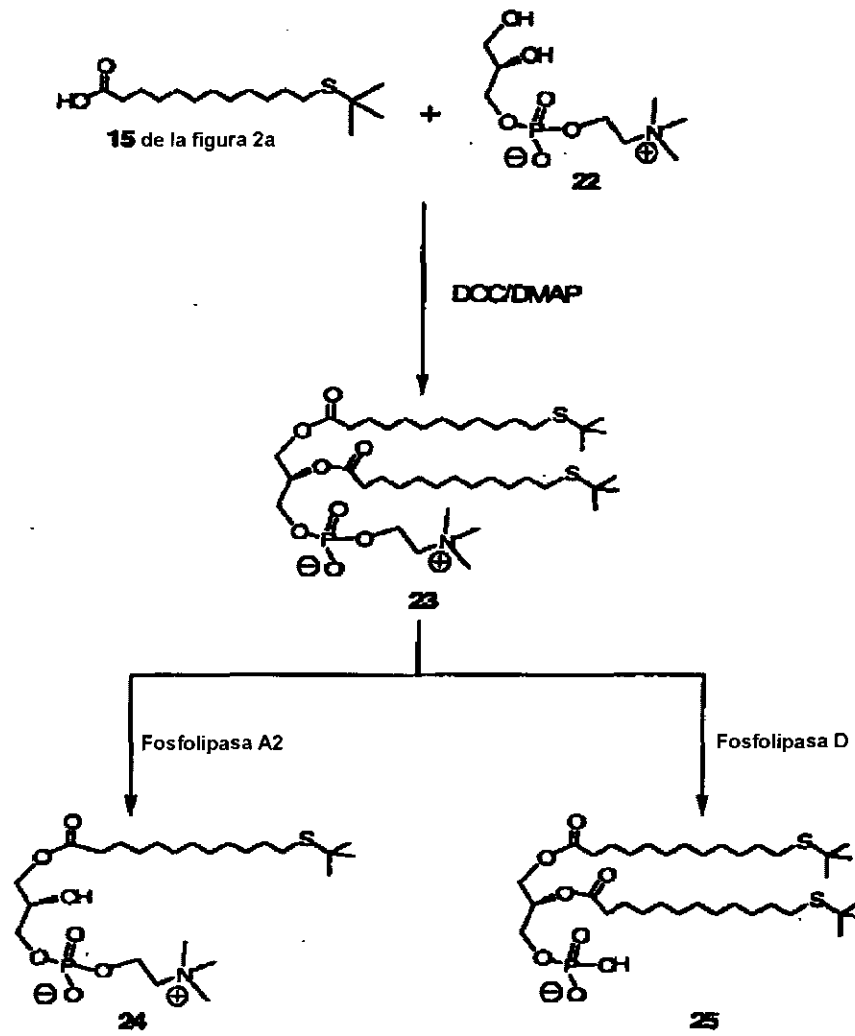


Figura 3a. Síntesis de un hapteno de LPA tiolado típico

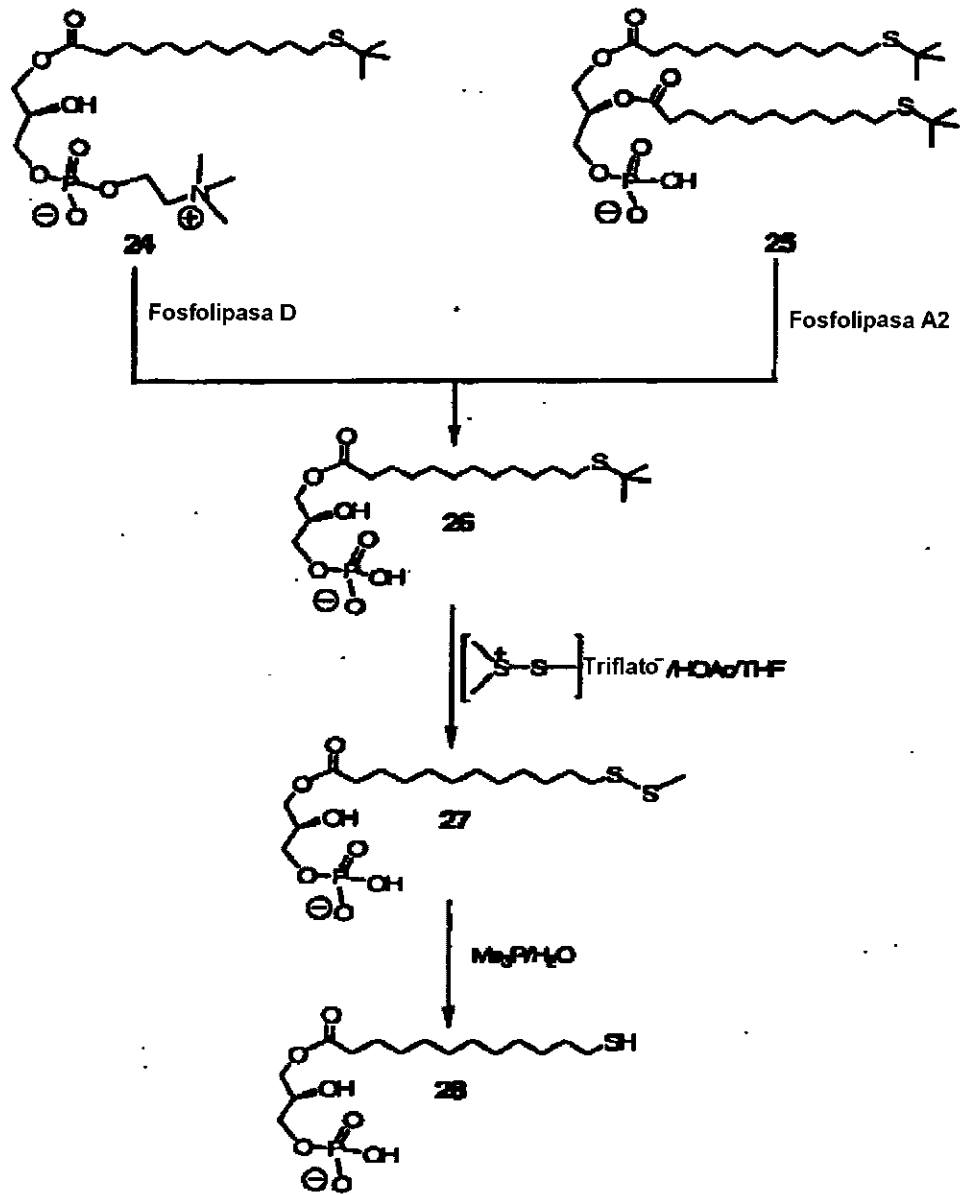


Figura 3b. Síntesis de un hapteno de LPA tiolado típico (continuación)

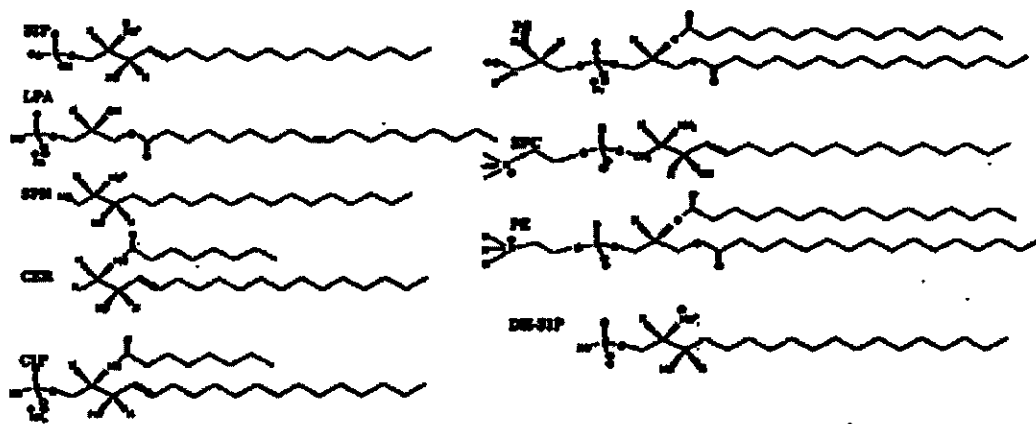
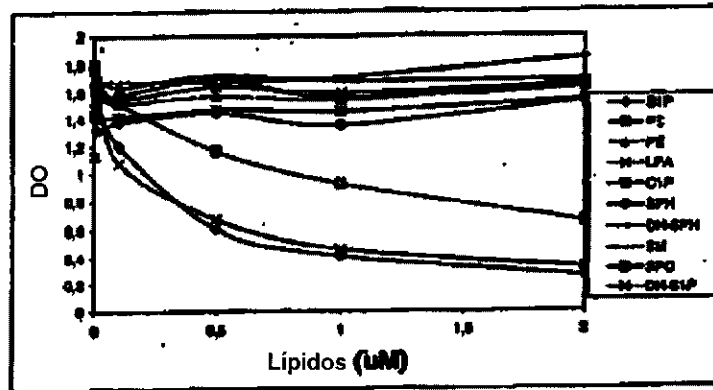


Figura 4

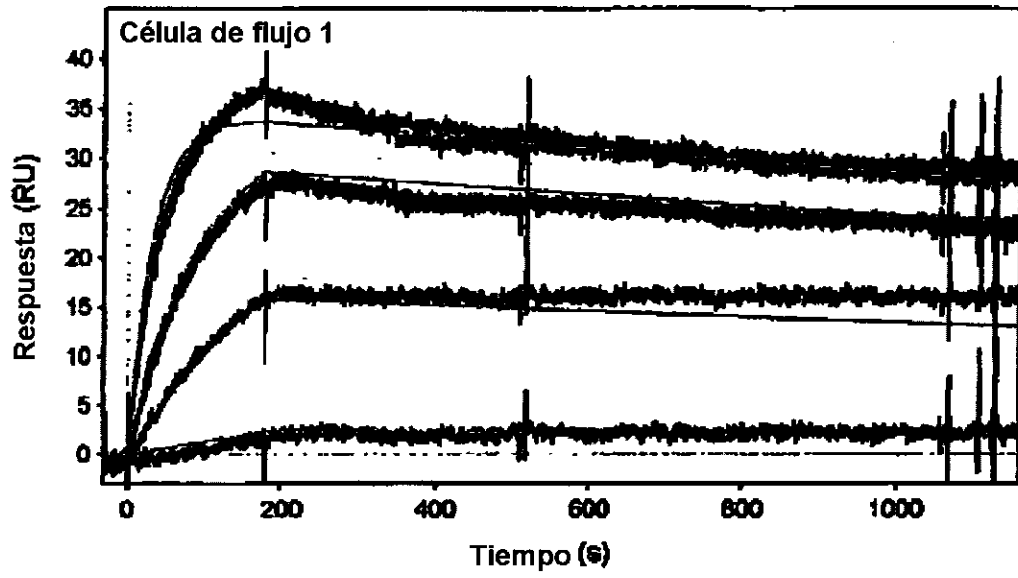


Figura 5

Figura 6

V _H	QNHLOSDRELKPCASWKSZAVSCTFIDHITLHNSQRPQCLEMTCLEPRDITKONBEPKQKALPKKSSYATYQNSLTFEDSAVPCN EGF KSTYDHPHGGQPTLTVS
V _L	ETVYQSRASLSAIGKXVTIHCITVDLDDSS NSQ QVCEPHELLS ECN LARSVAFRFSKQVQPLTTRWSEWADNYCLOSMLPFPKSGTKLEIX


```

PATH50      201 cctctcaactcctcatttcccaaggcaatattctctgctcctgagtcctccatcccatctccagcagtggtctcggtaacagactctcttttaccattg
PATH52C1    614 .....
PATH53C1    616 .....
PATH54C1    602 .....
PATH55C1    606 .....

PATH50      301 aaacatgctctcagcagatgtcgcagactactacigtctgcagagtgataacttaccattctccgctccggtggcacaagtttggatataaaacgtga
PATH52C1    711 .....
PATH53C1    714 .....
PATH54C1    706 .....
PATH55C1    707 .....

PATH50      401 gtcg
PATH52C1    816 ...
PATH53C1    816 ...
PATH54C1    808 ...
PATH55C1    808 ...

```

Alineamiento de las proteínas de las mutaciones del plásmido PATH50 para reemplazar el resto metionina (SEQ ID NO:17 y 22-25, respectivamente, en orden de aparición):

```

PATH50      13 miasaqfiglllllcfggtccctvtcqpsslsmaiqkvircitcttdiddmrvfqkpppppalllsagallrpgvpcrfsasgyutdflftlennla
PATH52C1    43) .....
PATH53C1    43) .....
PATH54C1    422 .....
PATH55C1    422 .....

PATH50      315 edvadyyclqedaipftfgsgtklelkrp
PATH52C1    737 .....
PATH53C1    730 .....
PATH54C1    722 .....
PATH55C1    722 .....

```

PATH52 (ADN: nucleótidos 15-403 de SEQ ID NO:18; PRT: SEQ ID NO:22)

430 ~~atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
Conductor
atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
>>>~~

530 ~~atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
CDR1
atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
>>>~~

630 ~~atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
CDR2
atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
>>>~~

730 ~~atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
CDR3
atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
>>>~~

PATH53 (ADN: nucleótidos 15-403 de SEQ ID NO:19; PRT: SEQ ID NO:23)

430 ~~atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
Conductor
atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
>>>~~

530 ~~atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
CDR1
atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
>>>~~

630 ~~atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
CDR2
atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
>>>~~

730 ~~atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
CDR3
atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc atgattgccc
>>>~~

PATH10: Secuencia de nucleótidos: Cadena pesada quimérica (SEQ ID NO:26)

```

1  ...
  Conductor
  >.....Cadena pesada quimérica de Sphingomab.....
101  ...
    FW1
    CDR1
    >.....Cadena pesada quimérica de Sphingomab.....
201  ...
    CDR2
    >.....Cadena pesada quimérica de Sphingomab.....
301  ...
    FW3
    CDR3
    >.....Cadena pesada quimérica de Sphingomab.....
401  ...
    FW4
    Cadena pesada quimérica de Sphingomab

```

PATH10 Secuencia de proteína (SEQ ID NO:27)

```

1  ...
101  ...

```

Alineamiento de los nucleótidos de las mutaciones del plásmido PATH10 (SEQ ID NO:26 y 28-34, respectivamente, en orden de aparición):

PATH10	1
PATH11C1	415
PATH12C2	415
PATH13C2	271
PATH14C1	378
PATH15C1	414
PATH16C1	265
PATH17C1	282

PATH10
 PATH11C1
 PATH12C2
 PATH13C2
 PATH14C1
 PATH15C1
 PATH16C1
 PATH17C1
 101 gggctccagtggaatctccgcaagggttccgggctccatctctctccctggccatadacttccactggatggagggggccctgacacaggccctcgaaacggat
 515
 515
 371
 678
 514
 365
 382

PATH10
 PATH11C1
 PATH12C2
 PATH13C2
 PATH14C1
 PATH15C1
 PATH16C1
 PATH17C1
 201 cggatgctctctcccgacatgatactctcaatgaaatgctcaggggcaaggccaccctgactcgagacaagctcctccactacaggcctacaca
 615
 615
 471
 578
 614
 465
 482

PATH10
 PATH11C1
 PATH12C2
 PATH13C2
 PATH14C1
 PATH15C1
 PATH16C1
 PATH17C1
 301 cgggtcaacagctcggacattggagactctggagctctctctctgcaagggggtctctccggtagtactatctggtctgactcttggggcccaaggca
 715
 715
 571
 678
 714
 565
 587

PATH 10
 PATH11C1
 PATH12C2
 PATH13C2
 PATH14C1
 PATH15C1
 PATH16C1
 PATH17C1
 401 ccaetctcagctctctccagcctccacccaaggccc
 815
 815
 671
 778
 814
 665
 687

815 ccaactctac agtccaccac gctccaccac agggccc
FW4
t t l i v s s a s t k q
>.....> Cadena pesada quimérica de Sphingomab (path11C1)

PATH12 (ADN: SEQ ID NO:29; PRT: SEQ ID NO:36)

415 .atgcaatgca gctgagcctt tctctctctt: atgcaatgca gctgagcctt gctgagcctt gctgagcctt gctgagcctt
Conductor
u s v a w v z j i f i a v t l y v h s q a h i q y a d z a l t k p
>.....> Cadena pesada quimérica de Sphingomab (path12C2)

515 gactctcagc tcaagcttct ctgctctctt tctctctt: gactctcagc tcaagcttct gactctcagc tcaagcttct
CW1
a s s v x i s c k v y p f i z i d h t a h w m k q r e q y i q w
>.....> Cadena pesada quimérica de Sphingomab (path12C2)

615 cggcctcctc agtccaccac gctccaccac agtccaccac agtccaccac agtccaccac
CW2
j q s i n p r h d i t k y n e m c k q y a t b e d x s a t t h y j
>.....> Cadena pesada quimérica de Sphingomab (path12C2)

715 caagtcacac tctgagcctt tgaagctctt gactctctt tctgctcag agtccaccac agtccaccac
FW3
y v n s i t f a q a v y z e a x q y f y s s t i e f d f u q y s
>.....> Cadena pesada quimérica de Sphingomab (path12C2)

815 ccaactctac agtccaccac gctccaccac agggccc
FW4
t t l i v s s a s t k q
>.....> Cadena pesada quimérica de Sphingomab (path12C2)

PATH13 (ADN: SEQ ID NO:30; PRT: SEQ ID NO:37)

271 .atgcaatgca gctgagcctt tctctctctt: atgcaatgca gctgagcctt gctgagcctt gctgagcctt gctgagcctt
Conductor
u s v a w v z j i f i a v t l y v h s q a h i q y a d z a l t k p
>.....> Cadena pesada quimérica de Sphingomab (path13C2)

371 gactctcagc tcaagcttct ctgctctctt tctctctt: gactctcagc tcaagcttct gactctcagc tcaagcttct
CW1
a s s v x i s c k v y p f i z i d h t a h w m k q r e q y i q w
>.....> Cadena pesada quimérica de Sphingomab (path13C2)

..... Cadena pesada quimérica de Spingomab (path13C2).....>

471 **CADENA PESADA QUIMÉRICA DE SPINGOMAB (PATH13C2)**
..... Cadena pesada quimérica de Spingomab (path13C2).....>

472 **CADENA PESADA QUIMÉRICA DE SPINGOMAB (PATH13C2)**
..... Cadena pesada quimérica de Spingomab (path13C2).....>

473 **CADENA PESADA QUIMÉRICA DE SPINGOMAB (PATH13C2)**
..... Cadena pesada quimérica de Spingomab (path13C2).....>

PATH14 (ADN: SEQ ID NO:31; PRT: SEQ ID NO:38)

474 **CADENA PESADA QUIMÉRICA DE SPINGOMAB (PATH14)**
..... Cadena pesada quimérica de Spingomab (path14).....>

475 **CADENA PESADA QUIMÉRICA DE SPINGOMAB (PATH14)**
..... Cadena pesada quimérica de Spingomab (path14).....>

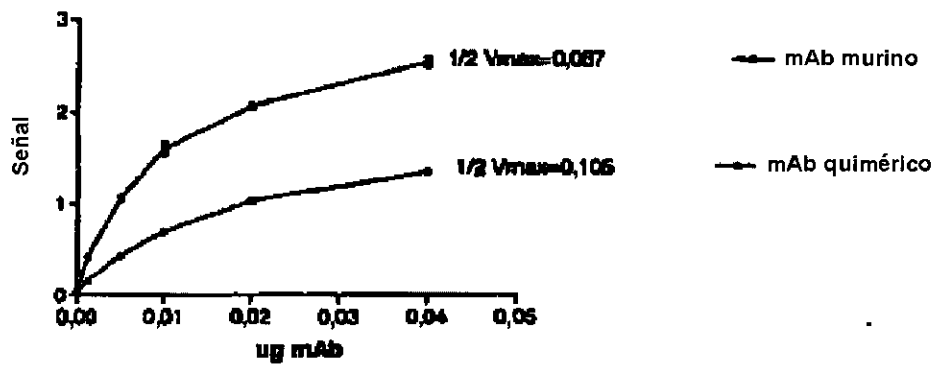
476 **CADENA PESADA QUIMÉRICA DE SPINGOMAB (PATH14)**
..... Cadena pesada quimérica de Spingomab (path14).....>

477 **CADENA PESADA QUIMÉRICA DE SPINGOMAB (PATH14)**
..... Cadena pesada quimérica de Spingomab (path14).....>

478 **CADENA PESADA QUIMÉRICA DE SPINGOMAB (PATH14)**
..... Cadena pesada quimérica de Spingomab (path14).....>

Figura 8

Ensayo de unión del anticuerpo S1P



Unión de S1P por anticuerpos 306D quiméricos y murinos

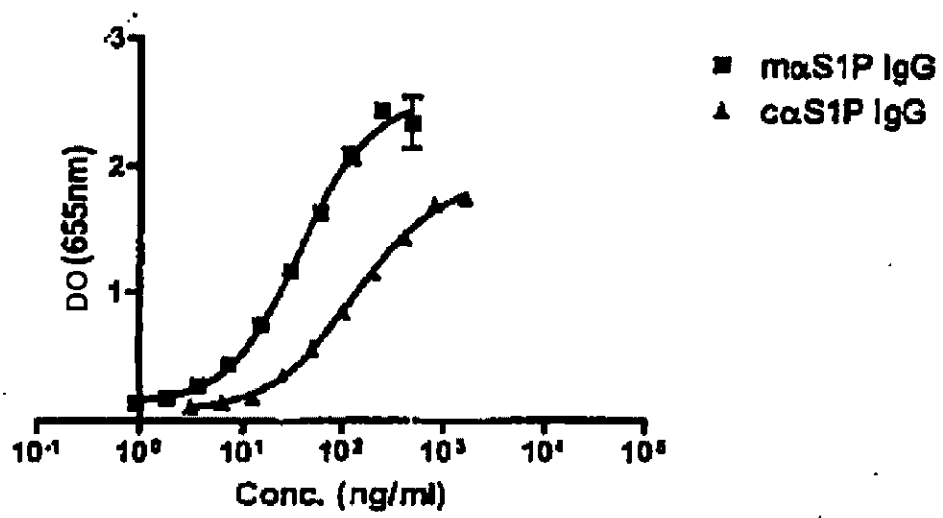


Figura 9