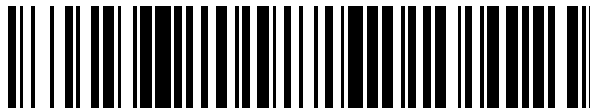


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 059**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/38 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2007 E 07871262 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2087002**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de unión a esfingosina-1-fosfato**

30 Prioridad:

27.10.2006 US 854971 P

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

03.12.2014

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.;
HANSEN, GENEVIEVE;
JONES, STEVEN, TARRAN y
WILLIAMS, DAVID, GARETH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 524 059 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

Composiciones y procedimientos de unión a esfingosina-1-fosfato

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención.**

5 La presente invención se refiere a agentes que se unen a esfingosina-1-fosfato (S1P) particularmente a anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos, y derivados de anticuerpos específicamente reactivos a S1P en condiciones fisiológicas. Dichos agentes se pueden usar en el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades o trastornos mediante la administración de composiciones farmacéuticas que contienen dichos agentes.

10 2. Antecedentes.

Lípidos bioactivos de señalización

15 Los lípidos y sus derivados se reconocen en la actualidad como importantes dianas para la investigación médica, no simplemente como elementos estructurales en las membranas celulares o como una fuente de energía para β -oxidación, glucólisis u otros procesos metabólicos. En particular, determinados lípidos bioactivos funcionan como mediadores de señalización importantes en enfermedades animales y humanas. Aunque la mayoría de los lípidos de la membrana plasmática desempeñan un papel exclusivamente estructural, una pequeña proporción de ellos están implicados en la transmisión de estímulos extracelulares en las células. "Señalización de lípidos" se refiere a cualquiera de una serie de rutas de transducción de señales celulares que usan lípidos de la membrana celular como segundos mensajeros, del mismo modo que se refiere a la interacción directa de una molécula de señalización de lípido con su propio receptor específico. Las rutas de señalización de lípidos se activan por una diversidad de estímulos extracelulares, que van desde factores de crecimiento a citoquinas inflamatorias, y regulan las decisiones del destino celular tales como apoptosis, diferenciación y proliferación. La investigación sobre la señalización de lípidos bioactivos es un área de intensa investigación científica a medida que se identifican más y más lípidos bioactivos y se caracterizan sus acciones.

25 Los ejemplos de lípidos bioactivos incluyen los eicosanoides (incluyendo los cannabinoides, leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienoicos, e isoicosanoides), mediadores de cannabinoides no eicosanoides, fosfolípidos y sus derivados, tales como ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilglicerol (PG), factor de activación de plaquetas (PAF) y cardiolipinas así como lisofosfolípidos tales como lisofosfatidil de colina (LPC) y diversos ácidos lisofosfatídicos (LPA). Los mediadores de lípidos bioactivos de señalización también incluyen los esfingolípidos tales como esfingomielina, ceramida, la ceramida-1-fosfato, esfingosina, colina esfingosilfosforilo, esfinganina, esfinganina-1-fosfato (Dihidro-SIP) y esfingosina-1-fosfato. Los esfingolípidos y sus derivados representan un grupo de moléculas de señalización extracelular e intracelular con efectos pleiotrópicos en los procesos celulares importantes. Otros ejemplos de lípidos bioactivos de señalización incluyen fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PEA), diacilglicérido (DG), sulfátidos, gangliósidos, y cerebrósidos.

35 Los esfingolípidos son una clase única de lípidos que se llamaron así, debido a su carácter inicialmente misterioso, por la Esfinge. Los esfingolípidos se caracterizaron inicialmente como componentes estructurales primarios de las membranas celulares, pero estudios recientes indican que los esfingolípidos también sirven como moléculas de señalización y de regulación celular (Hannun, *y col.*, Adv. Lipid Res. 25: 27-41, 1993; Spiegel, *y col.*, FASEB J. 10: 1388-1397, 1996; Igarashi, J. Biochem 122: 1080-1087, 1997; Hla, T. (2004). Semin Cell Dev Biol, 15, 513-2; Gardell, S.E., Dubin, A.E. y Chun, J. (2006). Trends Mol Med, 12, 65-75). Los esfingolípidos son componentes estructurales primarios de las membranas celulares que también sirven como la señalización celular y de regulación celular (Hannun y Bell, Adv. Lipid Res. 25: 27-41, 1993; Igarashi, J. Biochem 122: 1080-1087, 1997). Los esfingolípidos mediadores de la señalización, ceramida (CER), esfingosina (SPH) y esfingosina-1-fosfato (S1P), se han estudiado más ampliamente y se han valorado recientemente por sus papeles en el sistema cardiovascular, angiogénesis y biología tumoral (Claus, *y col.*, Curr Drug Targets 1: 185-205, 2000; Levade, *y col.*, Circ. Res. 89: 957-968, 2001; Wang, *y col.*, J. Biol. Chem. 274: 35343-50, 1999; Wascholowski y Giannis, Drug News Perspect. 14: 581-90, 2001; Spiegel, S. y Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. Nat Rev Mol Cell Biol, 4, 397-407; documento de patente US 6534323).

50 Para una revisión del metabolismo de los esfingolípidos, véase Liu, *y col.*, Crit Rev. Clin. Lab. Sci. 36: 511-573, 1999. Para revisiones de la ruta de señalización de la esfingomielina, véase Hannun, *y col.*, Adv. Lipid Res. 25: 27-41, 1993; Liu, *y col.*, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 36: 511-573, 1999; Igarashi, J. Biochem. 122: 1080-1087, 1997; Oral, *y col.*, J. Biol. Chem. 272: 4836-4842, 1997; y Spiegel *y col.*, Biochemistry (Moscú) 63: 69-83, 1998.

55 S1P es un mediador de la proliferación celular y protege de la apoptosis mediante la activación de las rutas de supervivencia (Maceyka, *y col.* (2002), BBA, vol. 1585): 192-201, y Spiegel, *y col.* (2003), Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 4: 397-407). Se ha propuesto que el equilibrio entre los niveles de CER/SPH y S1P proporciona un mecanismo de reóstato que decide si una célula se dirige a la ruta de la muerte o se protege de la apoptosis. La enzima reguladora clave del mecanismo de reóstato es la esfingosina quinasa (SPHK) cuya función es convertir los lípidos

bioactivos de señalización que promueven la muerte (CER/SPH) en el S1P que promueve el crecimiento. S1P tiene dos destinos: S1P se puede degradar por S1P liasa, una enzima que escinde S1P a fosfoetanolamina y hexadecanal, o, menos común, se hidroliza por la S1P fosfatasa a SPH.

Las actividades biológicas pleiotrópicas de S1P mediaban a través de una familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) conocidos originalmente como Genes de Diferenciación Endotelial (EDG). Se han identificado cinco GPCR como receptores S1P de alta afinidad (S1PR): S1P₁/EDG-1, S1P₂/EDG-5, S1P₃/EDG-3, S1P₄/EDG-6, y S1P₅/EDG-8 solo identificado tan tarde como en 1998 (Lee, y col., 1998). Muchas de las respuestas evocadas por S1P se acoplan a diferentes proteínas G heterotriméricas (G_q, G_i, G₋₁₂₋₁₃) y las pequeñas GTPasas de la familia Rho (Gardell, y col., 2006).

En el adulto, S1P se libera de las plaquetas (Murata y col., 2000) y mastocitos para crear un pulso local de S1P libre (suficiente para superar la K_d de los S1PR) para promover la cicatrización de heridas y participar en la respuesta inflamatoria. En condiciones normales, la S1P total en el plasma es bastante elevada (300-500 nM); sin embargo, se ha planteado la hipótesis de que la mayoría de la S1P se puede 'tamponar' por las proteínas séricas, en particular lipoproteínas (por ejemplo, HDL > LDL > VLDL) y albúmina, de modo que la S1P biodisponible (o la fracción libre de S1P) no es suficiente para activar apreciablemente las S1PR (Murata y col., 2000). Si este no fuera el caso, aparecería una angiogénesis e inflamación inapropiadas. Además, se han sugerido acciones intracelulares de S1P (véase, por ejemplo, Spiegel S, Kolesnick R (2002), *Leukemia*, vol. 16: 1596-602; Suomalainen, y col (2005), *Am J Pathol*, vol. 166: 773-81).

Una amplia expresión de los receptores de S1P de la superficie celular permite que S1P incluya en un amplio espectro de respuestas celulares, e incluye proliferación, adhesión, contracción, motilidad, morfogénesis, diferenciación y supervivencia. Parece que este espectro de respuestas depende de los patrones de expresión de solapamiento o distintos de los receptores de S1P en los sistemas de células y tejidos. Además, se ha demostrado recientemente la interferencia entre las rutas de señalización de S1P y del factor de crecimiento de, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) (véase, por ejemplo, Baudhuin, y col. (2004), *FASEB J*, vol. 18: 341-3). La regulación de diversos procesos celulares que implican S1P tiene un impacto en particular en la señalización neuronal, tono vascular, curación de heridas, tráfico de células inmunes, reproducción y función cardiovascular, entre otros. Las alteraciones de los niveles endógenos de S1P dentro de estos sistemas pueden tener efectos perjudiciales, provocando varias afecciones fisiopatológicas, que incluyen cáncer, inflamación, angiogénesis, enfermedades cardíacas, asma, y enfermedades autoinmunes.

Un nuevo enfoque reciente para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluyendo enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares, y diversos tipos de cáncer, implica la reducción de los niveles de S1P biológicamente disponible, solo o en combinación con otros tratamientos. Aunque se han propuesto estrategias de tratamiento basadas en esfingolípidos que se dirigen a las enzimas clave de la ruta metabólica de los esfingolípidos, tales como SPHK, no se ha puesto énfasis en la interferencia con el mediador lipídico S1P hasta hace poco, en gran parte debido a las dificultades en la mitigación directa de esta diana de lípidos, en particular debido a la dificultad primero en el aumento y a continuación en la detección de anticuerpos frente a la diana de S1P.

Recientemente, se ha descrito la generación de anticuerpos específicos para S1P. Véase, por ejemplo, del mismo solicitante, la solicitud de patente de Estados Unidos con N° de Serie 20070148168; documento de patente WO2007/053447 o documento de patente WO2006/078336. Dichos anticuerpos, que por ejemplo, pueden adsorber selectivamente S1P del suero, actúan como esponjas moleculares para neutralizar la S1P extracelular. Véanse también las patentes de Estados Unidos del mismo solicitante N° 6.881.546 y N° 6.858.383 y la solicitud de patente de Estados Unidos con número de serie U 10/029.372, SPHINGOMAB™, el anticuerpo monoclonal murino (mAb) desarrollado por Lpath, Inc. y que se describe en Bradley y col., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, abril de 2006, Vol. 47, N° 3034, página 714, y en determinadas patentes o solicitudes de patente que se han enumerado anteriormente, ha mostrado que es eficaz en modelos de enfermedad humana. En algunas situaciones, un anticuerpo humanizado puede ser preferente a un anticuerpo murino, particularmente para usos terapéuticos en seres humanos, en los que se puede producir una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA). Dicha respuesta puede reducir la eficacia del anticuerpo mediante la neutralización de la actividad de unión y/o mediante la eliminación rápidamente del anticuerpo de la circulación en el organismo. La respuesta HAMA también puede causar toxicidad con las administraciones posteriores de anticuerpos de ratón.

Un anticuerpo anti-S1P humanizado se ha desarrollado ahora y se describe en el presente documento. Se espera que este anticuerpo tenga todas las ventajas del mAb murino en términos de eficacia en la unión a S1P, neutralización de S1P y modulación de las patologías relacionadas con S1P, pero con ninguna de las desventajas potenciales del mAb murino cuando se usa en un contexto humano. Tal como se describe en los ejemplos en lo sucesivo en el presente documento, este anticuerpo humanizado (denominado LT1009 o sonepcizumab) tiene, de hecho, una actividad mayor que la del anticuerpo precursor (murino) en modelos animales de enfermedad.

3. Definiciones

Antes de describir la presente invención con detalle, se definirán varios términos usados en el contexto de la presente

invención. Además de estos términos, si fuera necesario se definen otros en cualquier parte de la memoria descriptiva. A menos que se defina expresamente de otro modo en el presente documento, los términos de la técnica usados en la presente memoria descriptiva tendrán sus significados reconocidos en la técnica. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, será la dominante.

5 Un "resto derivado inmunitario" incluye cualquier anticuerpo (Ab) o inmunoglobulina (Ig), y se refiere a cualquier forma de péptido, polipéptido derivado de, modelado después o codificado por, un gen de inmunoglobulina, o un fragmento de dicho péptido o polipéptido que es capaz de unirse a un antígeno o epítipo (véase, por ejemplo, Immunobiology, 5ª Edición, Janeway, Travers, Walport, Shlomchik. (editores), Garland Publishing (2001)). En la presente invención, era antígeno es una molécula de lípido bioactivo.

10 Un "anticuerpo anti-S1P" o un "resto derivado inmunitario reactivo frente a S1P" se refiere a cualquier anticuerpo o molécula derivada de anticuerpo que se une a S1P. Tal como se entenderá a partir de estas definiciones, los anticuerpos o restos derivados inmunitarios pueden ser policlonales o monoclonales y se pueden generar a través de una diversidad de medios, y/o se pueden aislar a partir de un animal, incluyendo un sujeto humano.

15 Un "lípido bioactivo" se refiere a una molécula de señalización de lípidos. En general, un lípido bioactivo no reside en una membrana biológica cuando ejerce sus efectos de señalización, lo que quiere decir que, aunque dicha especie de lípido puede existir en algún punto en una membrana biológica (por ejemplo, una membrana celular, una membrana de un orgánulo celular, etc.), cuando se asocia con una membrana biológica no es un "lípido bioactivo" sino que es una molécula "lípido estructural". Los lípidos bioactivos se distinguen de los lípidos estructurales (por ejemplo, fosfolípidos unidos a membrana) en que median en la señalización extracelular y/o intracelular y por lo tanto están implicados en el control de la función de muchos tipos de células mediante la modulación de la diferenciación, migración, proliferación, secreción, supervivencia, y otros procesos. Los lípidos bioactivos se pueden encontrar *in vivo* en los fluidos extracelulares, en los que pueden formar complejos con otras moléculas, por ejemplo, proteínas de suero, tales como albúmina y lipoproteínas, o en forma "libre", es decir, no formando complejos con otras especies de moléculas. Como mediadores extracelulares, algunos lípidos bioactivos alteran la señalización celular mediante la activación de canales iónicos unidos a la membrana o receptores acoplados a proteínas G que, a su vez, activan los sistemas de señalización complejos que dan como resultado cambios en la función o en la supervivencia celular. Como mediadores intracelulares, los lípidos bioactivos pueden ejercer sus acciones interactuando directamente con los componentes intracelulares tales como enzimas y canales iónicos. Los ejemplos representativos de lípidos bioactivos incluyen LPA y S1P.

20 30 La expresión "agente terapéutico" significa un agente que mitiga la angiogénesis y/o neovascularización, por ejemplo, maduración de CNV y BV, edema, permeabilidad vascular y fibrosis, fibrogénesis y cicatrización asociada con, o que forma parte de la patología subyacente de, enfermedades y afecciones oculares.

35 La expresión "terapia de combinación" se refiere a un régimen terapéutico que implica la provisión de al menos dos terapias de tintas para conseguir un efecto terapéutico indicado. Por ejemplo, una terapia de combinación puede implicar la administración de dos o más principios activos químicamente distintos, por ejemplo, un anticuerpo anti-LPA y un anticuerpo anti-S1P. Como alternativa, una terapia de combinación puede implicar la administración de un resto derivado inmunitario reactivo frente al un lípido bioactivo y la administración de uno u otros agentes quimioterapéuticos más. Como alternativa, la terapia de combinación puede implicar la administración de un anticuerpo anti-lípido junto con la administración de otro tratamiento, tal como terapia de radiación y/o cirugía. Además, una terapia de combinación puede implicar la administración de un anticuerpo anti-lípido junto con uno u otros agentes biológicos más (por ejemplo, agente anti-VEGF, TGF β , PDGF, o bFGF), agentes quimioterapéuticos y otro tratamiento tal como radiación y/o cirugía. En el contexto de la terapia de combinación que usa dos o más principios activos químicamente distintos, se entiende que los principios activos se pueden administrar como parte de la misma composición o como composiciones diferentes. Cuando se administran como composiciones separadas, las composiciones que comprenden los diferentes principios activos se pueden administrar en las mismos o en momentos diferentes, mediante las mismas o diferentes rutas, usando los mismos o diferentes regímenes de dosificación, todo tal como lo requiera el contexto en particular y tal como lo determina el médico que prescribe. De forma análoga, cuando una o más especies de anticuerpos anti-lípidos, por ejemplo, un anticuerpo anti-LPA, solo o en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos se combinan con, por ejemplo, radiación y/o cirugía, el fármaco(s) se puede administrar antes o después de la cirugía o el tratamiento de radiación.

50 Un " agente anti-S1P" se refiere a cualquier agente que es típicamente reactivo para S1P, e incluye anticuerpos o moléculas derivadas de anticuerpos o restos no derivados de anticuerpos que se unen a S1P y sus variantes.

55 Un "hapteno" se refiere a una molécula adaptada para la conjugación a un hapteno, haciendo inmunogénico de ese modo al hapteno. Una clase representativa, la limitante de moléculas de hapteno son las proteínas, ejemplos de las cuales incluyen albúmina, hemocianina de lapa de ojos de cerradura, hemaglutinina, tétanos y toxoide de la difteria. En la técnica se conocen otras clases y ejemplos de moléculas de hapteno adecuados para uso de acuerdo con la invención. Estos, así como haptenos de origen natural o sintético que se descubrieron o inventaron posteriormente, se pueden adaptar para su aplicación de acuerdo con la invención.

La expresión "agente quimioterapéutico" significa agentes anticáncer y otros agentes antihiperproliferativos. En pocas

palabras, un "agente quimioterapéutico" se refiere a un producto químico destinado a destruir células y tejidos. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a: (1) agentes que dañan el ADN y de agentes que inhiben la síntesis de ADN: antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina, donorrubicina, epirubicina), agentes de alquilación (bendamustina, busulfán, carboplatino, carmustina, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, dacarbazina, hexametilmelamina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, mitotano, mitomicina, pipobromano, procarbazona, estreptozocina, tiotepa y trietilenmelamina), derivados de platino (cisplatino, carboplatino, cis diaminodicloroplatino), inhibidores de la telomerasa y la topoisomerasa (Camptosar), (2) agentes de despolimerización de la tubulina: taxoides (Paclitaxel, docetaxel, BAY 59-8862), (3) antimetabolitos tales como capecitabina, clorodesoxiadenosina, citarabina (y su forma activada, ara-CMP), arabinósido de citosina, dacabazina, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, 5-DFUR, gemcitabina, hidroxiurea, 6-mercaptopurina, metotrexato, pentostatina, trimetrexato, y 6-tioguanina (4) antiangiogénicos (Avastin, talidomida, sunitinib, lenalidomida), agentes de alteración vascular (flavonoides/flavonas, DMXAA, derivados de combretastatina tales como CA4DP, ZD6126, AVE8062A, etc.), (5) productos biológicos tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (Herceptin, Avastin, Panorex, Rituxan, Zevalin, Mylotarg, Campath, Bexar, Erbitux, Lucentis), y (6) terapia endocrina: inhibidores de la aromatasa (4-hidroandrostendiona, exemestano, aminoglutetimida, anastrozol, letozol), antiestrógenos (Tamoxifeno, Toremifeno, Raioxifeno, Faslodex), esteroides tales como dexametasona, (7) inmunomoduladores: citoquinas tales como IFN-beta e IL2), inhibidores de integrinas, otras proteínas de adhesión y metaloproteinasas de matriz), (8) inhibidores de histona desacetilasa, (9) inhibidores de la transducción de señales como inhibidores de tirosina quinasa tales como imatinib (Gleevec), (10) inhibidores de proteínas de choque térmico, (11) retinoides tales todos los ácidos trans retinoicos, (12) inhibidores de receptores del factor de crecimiento o los factores de crecimiento en sí mismos, (13) compuestos antimitóticos tales como navelbina, Paclitaxel, taxotere, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, (14) antiinflamatorios tales como inhibidores de la COX y (15) reguladores del ciclo celular, por ejemplo, regulardores del punto de control e inhibidores de la telomerasa.

El término "esfingolípido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la clase de compuestos conocidos en la técnica como esfingolípidos, que incluyen, pero no se limitan a los siguientes compuestos (véase <http://www.lipidmaps.org> como el sitio que contiene los enlaces indicados por las cadenas alfanuméricas entre corchetes a continuación, cuyos enlaces contienen fórmulas químicas, información estructural, etc. para los compuestos correspondientes):

Bases esfingoides [SP01]
 Esfing-4-eninas (Esfingosinas) [SP0101]
 Esfinganinas [SP0102]
 4-Hidroxiesfinganinas (Fitoesfingosinas) [SP0103]
 Homólogos y variantes de base esfingoides [SP0104]
 1-fosfatos de base esfingoides [SP0105]
 Lisoesfingomielinas y lisoglicoesfingolípidos [SP0106]
 Bases esfingoides N-metiladas [SP0107]
 Análogos de base esfingoides [SP0108]
 Ceramidas [SP02]
 N-acilesfingosinas (ceramidas) [SP0201]
 N-acilesfinganinas (dihidroceramidas) [SP0202]
 N-Acil-4-hidroxiesfinganinas (fitoceramidas) [SP0203]
 Acilceramidas [SP0204]
 1-Fosfatos de ceramida [SP0205]
 Fosfoesfingolípidos [SP03]
 Ceramida fosfocolinas (esfingomielinas) [SP0301]
 Ceramida fosfoetanolaminas [SP0302]
 Ceramida fosfoinositoles [SP0303]
 Fosfonoesfingolípidos [SP04]
 Glicoesfingolípidos neutros [SP05]
 Series de Glc simples (GlcCer, LacCer, etc) [SP0501]
 GalNAcb1-3Gala1-4Galb1-4Glc- (Serie Globo) [SP0502]
 GalNAcb1-4Galb1-4Glc- (Serie Ganglio) [SP0503]
 Galb1-3GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (Serie Lacto) [SP0504]
 Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4Glc- (Serie Neolacto) [SP0505]
 GalNAcb1-3Galal-3Galbl-4Glc- (Serie Isoglobo) [SP0506]
 GlcNAcb1-2Mana1-3Manb1-4Glc- (Serie Mollu) [SP0507]
 GalNAcb1-4GlcNAcb1-3Manb1-4Glc- (Serie Arthro) [SP0508]
 Gal- (Serie Gala) [SP0509]
 Otros [SP0510]
 Glicoesfingolípidos ácidos [SP06]
 Gangliósidos [SP0601]
 Sulfoglicoesfingolípidos (sulfatidas) [SP0602]
 Glucuronoesfingolípidos [SP0603]
 Fosfoglicoesfingolípidos [SP0604]
 Otros [SP0600]

Glicoesfingolípidos básicos [SP07]
 Glicoesfinlípidos anfóteros [SP08]
 Arsenoesfingolípidos [SP09]

5 La presente invención proporciona agentes S1P anti-esfingolípidos que son útiles para tratar o prevenir trastornos hiperproliferativos tales como cáncer y enfermedades y trastornos cardiovasculares o cerebrovasculares y diversos trastornos oculares, tal como se describe con mayor detalle a continuación. En particular, la invención se prepara para S1P y sus variantes que incluyen, pero no se limitan a esfingosina-1-fosfato [esfingeno-1-fosfato; D-eritro-esfingosina-1-fosfato; esfing-4-enina-1-fosfato; ácido (E,2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-octadec-4-enoxi]fosfónico (AS 26993-30-6), DHS1P se define como dihidroesfingosina-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]; SPC es esfingosilfosforil colina, lisoefingomielina, esfingosilfosfocolina, esfingosina fosforilcolina, etanaminio; 2-(((2-amino-3-hidroxi-4-octadecenil)oxi)hidroxifosfinil)oxi)-N,N,N-trimetil-, cloruro, (R-(R*,S*(E))), cloruro de 2-(((E,2R,3S)-2-amino-3-hidroxi-octadec-4-enoxi)-hidroxifosforil)oxietil-1-trimetil-azanio (CAS 10216-23-6).

15 El término "epítipo" o "determinante antigénico" cuando se usa en el presente documento, a menos que se indique de otro modo, se refiere a la región de S1P a la que es reactivo un agente anti-S1P.

20 La expresión "trastorno hiperproliferativo" se refiere a enfermedades y trastornos asociados con la proliferación de células incontrolada, incluyendo, pero no limitado crecimiento incontrolado de células de órganos y tejidos que da como resultado cánceres o neoplasia y tumores benignos. Los trastornos hiperproliferativos asociados con células endoteliales pueden dar como resultado enfermedades de angiogénesis tales como angiomas, endometriosis, obesidad, degeneración macular relacionada con la edad y diversas retinopatías, así como la proliferación de células endoteliales y células del músculo liso que causan reestenosis como consecuencia de colocación de endoprótesis vascular en el tratamiento de la aterosclerosis. Los trastornos hiperproliferativos que implican fibroblastos (por ejemplo, fibrogénesis) incluyen, pero no se limitan a, trastornos de cicatrización excesiva (por ejemplo, fibrosis) tal como degeneración macular relacionada con la edad, remodelación e insuficiencia cardíaca asociada con el infarto de miocardio, curación de heridas excesiva tal como se produce normalmente como consecuencia de cirugía o lesión, queloides, y tumores fibroides y colocación de endoprótesis vascular.

25 Las composiciones de la invención se usan en procedimientos de terapia basada en esfingolípidos. "Terapia" se refiere a la prevención y/o tratamiento de enfermedades, trastornos o traumatismos físicos.

30 "Terapia cardiovascular" incluye terapia cardíaca así como prevención y/o tratamiento de otras enfermedades asociadas con el sistema cardiovascular, tal como enfermedad cardíaca. La expresión "enfermedad cardíaca" incluye cualquier tipo de enfermedad, trastorno, traumatismo o tratamiento quirúrgico que implica el corazón o tejido del miocardio. Son de particular interés las enfermedades que se relacionan con la hipoxia y/o isquemia de tejido del miocardio y/o insuficiencia cardíaca. Un tipo de enfermedad cardíaca que puede resultar de la isquemia es la lesión por reperfusión, tal como se puede producir cuando se usan anticoagulantes, agentes trombolíticos, o medicaciones medicamentos antianginosos en terapia, o cuando la musculatura cardíaca se abre quirúrgicamente por angioplastia o por cirugía de revascularización de la arteria coronaria. Otro tipo de enfermedad cardíaca a la que se dirige la invención es la enfermedad de la arteria coronaria (CAD), que puede aparecer a partir de arteriosclerosis, particularmente aterosclerosis, una causa común de isquemia. La CAD presenta síntomas tales como angina de pecho estable o inestable, y puede conducir a infartos de miocardio (MI) y muerte cardíaca súbita. Las afecciones de interés en particular incluyen, pero no se limitan a, isquemia del miocardio; infarto de miocardio agudo (AMI); enfermedad de la arteria coronaria (CAD); síndrome coronario agudo (ACS); lesión de células y tejido cardíaco que se puede producir durante o como consecuencia de revascularización percutánea (angioplastia coronaria) con o sin colocación de endoprótesis vascular; cirugía de revascularización coronaria (CABG) u otros procedimientos o terapias quirúrgicos o médicos que pueden causar lesión isquémica o isquémica/reperfusión en seres humanos; y traumatismo cardiovascular. La expresión "insuficiencia cardíaca" incluye infarto de miocardio agudo, miocarditis, una cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, choque séptico, traumatismo cardíaco e insuficiencia cardíaca idiopática. El espectro de afecciones sistémicas que dan como resultado insuficiencia cardíaca se denomina Síndrome Coronario Agudo (ACS).

50 La expresión "agente cardioterapéutico" se refiere a una gente que es terapéutico para enfermedades y enfermedades causadas por o asociadas con enfermedades y trastornos cardíacos y del miocardio.

"Terapia cerebrovascular" se refiere a terapia dirigida a la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con isquemia cerebral y/o hipoxia. Es de particular interés la isquemia cerebral y/o hipoxia resultante de isquemia global que resulta de una enfermedad cardíaca, incluyendo, pero no limitado a insuficiencia cardíaca.

55 La expresión "metabolito esfingolípidos" se refiere a un compuesto a partir de que se fabrica un esfingolípidos, así como uno que resulta de la degradación de un esfingolípidos en particular. En otras palabras, un "metabolito esfingolípidos" es un compuesto que está implicado en las rutas metabólicas de los esfingolípidos. Los metabolitos incluyen precursores metabólicos y productos metabólicos. La expresión "precursores metabólicos" se refiere a compuesto su parte de los que se fabrican los esfingolípidos. Los precursores metabólicos de interés en particular incluyen, pero no se limitan a, SPC, esfingomielina, dihidroesfingosina, dihidroceramida, y 3-cetoesfinganina. La expresión "productos metabólicos"

se refiere a compuestos que resultan de la degradación de esfingolípidos, tales como fosforilcolina (por ejemplo, fosfocolina, fosfato de colina), ácidos grasos, incluyendo ácidos grasos libres, y hexadecanal (por ejemplo, palmitaldehído).

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" abarca todo el espectro de tratamientos para una enfermedad o trastorno. Un agente "terapéutico" de la invención puede actuar de una manera que sea profiláctica o preventiva, incluyendo los que incorporan procedimientos diseñados para dirigirse a individuos que se pueden identificar como de riesgo (farmacogenética); o de una manera que sea paliativa o curativa por naturaleza; o puede actuar para disminuir la velocidad o la extensión de la progresión de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno que se está tratando; o puede actuar para reducir al mínimo el tiempo requerido, la aparición o la extensión de cualquier incomodidad o dolor, o limitaciones físicas asociadas con la recuperación de una enfermedad, trastorno o traumatismo físico; o se puede usar como un adyuvante para otras terapias y tratamientos.

"Tratamiento" se refiere tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Los pacientes con necesidad de tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno así como aquéllos en los que se va a prevenir el trastorno.

15 La expresión "terapia de combinación" se refiere a un régimen terapéutico que implica la provisión de al menos dos terapias distintas para conseguir un efecto terapéutico indicado. Por ejemplo, una terapia de combinación puede implicar la administración de dos o más principios activos químicamente distintos, por ejemplo, un agente quimioterapéutico de acción rápida y un anticuerpo antilipídico. Como alternativa, una terapia de combinación puede implicar la administración de un anticuerpo antilipídico y/o uno o más agentes quimioterapéuticos, solos o junto con la administración de otro tratamiento, tal como terapia de radiación y/o cirugía. Además, una terapia de combinación puede implicar la administración de un anticuerpo antilipídico junto con uno u otros agentes biológicos más (por ejemplo, agente anti-VEGF, TGF β , PDGF, o bFGF), agentes quimioterapéuticos y otro tratamiento tal como radiación y/o cirugía. En el contexto de la administración de dos o más principios activos químicamente distintos, se entiende que los principios activos se pueden administrar como parte de la misma composición o como composiciones diferentes. Cuando se administran como composiciones separadas, las composiciones que comprenden los diferentes principios activos se pueden administrar en el mismo momento o en momentos diferentes, mediante la misma o diferentes rutas, usando el mismo o diferentes regímenes de dosificación, todo tal como lo requiera el contexto en particular y tal como lo determine el médico que prescribe. De forma análoga, cuando una o más especies de anticuerpos antilipídicos, por ejemplo, un anticuerpo anti-LPA, solo o en conjunto con uno o más agentes quimioterapéuticos se combinan con, por ejemplo, radiación y/o cirugía, el fármaco o fármacos se pueden administrar antes o después del tratamiento de cirugía o radiación.

"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 o como varias dosis en el tiempo.

35 "Neoplasia" o "cáncer" se refiere a un crecimiento celular anómalo e incontrolado. Una "neoplasia", o tumor o cáncer, es una proliferación anómala, sin regular, y desorganizada del crecimiento celular, y por lo general se denomina cáncer. Una neoplasia puede ser benigna o maligna. Una neoplasia es maligna, o cancerosa, si tiene propiedades de crecimiento destructor, capacidad de invasión, y metástasis. Capacidad de invasión se refiere a la extensión local de una neoplasia por infiltración o destrucción del tejido circundante, que por lo general llega a las láminas basales que definen los límites de los tejidos, entrando a menudo de este modo en el sistema circulatorio del organismo. Por lo general, metástasis se refiere a la diseminación de células tumorales a través de vasos linfáticos o sanguíneos. Metástasis también se refiere a la migración de células tumorales por extensión directa a través de cavidades serosas, o subaracnoideas u otros espacios. A través del proceso de metástasis, la migración de células tumorales para otras áreas del organismo establece neoplasias en áreas alejadas del sitio de aparición inicial.

45 Para fines de tratamiento, "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, deportes, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Habitualmente, los "anticuerpos nativos" e "inmunoglobulinas nativas" son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Daltons, formadas por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadenas espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (V_H) en un extremo seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en el extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los restos de aminoácidos en particular forman una superficie de contacto entre los dominios variados de cadena ligera y pesada.

La expresión región "variable" comprende marco conservado y CDR (conocida de otro modo como hipervariables) y se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo para su antígeno en particular. Sin

embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan región marco conservada (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectados por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígenos de anticuerpos (véase Kabat, y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), páginas 647-669). Los dominios constantes no se ven implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígenos. La región hipervariable comprender restos de aminoácido a partir de una "región que determina la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2), y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2), y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat, y col. (1991), mencionado anteriormente) y/o los restos a partir de un "bucle hipervariable" (por ejemplo los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2), y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chotia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Los restos de la región "marco conservada" o "FR" son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable tal como se define en el presente documento.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígenos idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión antígenos, y un fragmento de "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento de $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígenos y es capaz de reticulación de antígenos.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y de unión de antígenos. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación o covalentes, estrecha. En esta configuración es en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígenos en la superficie del dímero V_H-V_L . De forma colectiva, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígenos al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (por la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y de unir antígenos, aunque con una afinidad menor que todo el sitio de unión.

El fragmento de Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de Fab' se diferencian de los fragmentos de Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En el presente documento, Fab'-SH es la denominación de Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se producían originalmente como pares de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Además, se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. En la actualidad existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos, y agentes aglutinantes que usan las CDR (o variante de la misma que retienen actividad de unión a antígenos) del anticuerpo precursor. En el presente documento los anticuerpos se definen como que retienen al menos una actividad deseada del anticuerpo precursor. Las actividades deseadas pueden incluir la capacidad de unirse específicamente al antígeno, la capacidad de inhibir la proliferación *in vitro*, la capacidad de inhibir la angiogénesis *in vivo*, y la capacidad para alterar el perfil de citoquinas *in vitro*. Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la unión al antígeno o dominio variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, y fragmentos de Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, por ejemplo, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos frente a un único sitio antigénico. Además, por el contrario a las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que por lo general incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como a que se obtiene a partir de una población de anticuerpos básicamente homogénea, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención se pueden fabricar mediante el procedimiento del hibridoma descrito primero en Kohler, y *col.*, Nature 256: 495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas que se describen, por ejemplo, en Clackson, y *col.*, Nature 352: 624-628 (1991) y Marks y *col.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991).

En el presente documento, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison, y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá básicamente todos de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en los que todas o básicamente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o básicamente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones, y *col.*, Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann, y *col.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992) y Hansen, documento de patente WO2006105062.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de una sola cadena" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpos, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido de Fv comprende adicionalmente un engarce de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión antígenos, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). Mediante el uso de un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a que se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, el documento de patente EP 404.097; documento de patente WO 93/11161; y Hollinger, y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

La expresión "anticuerpos lineales" cuando se usa a través de la presente memoria descriptiva se refiere a los anticuerpos que se describen en Zapata, y *col.* Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (V_H-C_H1-V_H-C_H1) que forman un par de regiones de unión a antígenos. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Una "variante" de anticuerpo anti-esfingolípido, en el presente documento se refiere a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de anticuerpo anti-esfingolípido "precursor" debido a la adición, supresión, y/o sustitución de uno o más resto(s) de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo precursor y mantiene al menos una actividad deseada del anticuerpo de antiunión precursor. Las actividades deseadas pueden incluir la capacidad de unirse específicamente al antígeno, la capacidad de inhibir la proliferación *in vitro*, la capacidad de inhibir la angiogénesis *in vivo*, y la capacidad de alterar el perfil de citoquinas *in vitro*. En una realización, la variante comprende la sustitución o sustituciones de uno o más aminoácidos en una o más región o regiones hipervariables del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos uno, por ejemplo, de aproximadamente

uno a aproximadamente diez, y preferentemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo precursor. Habitualmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 50 % con las secuencias de dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo precursor, más preferentemente una identidad de secuencia de al menos un 65 %, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, y más preferentemente al menos un 95 %. En el presente documento, la identidad o la homología con respecto a esta secuencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos de anticuerpo precursor, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia. No se interpretará que ninguno de N-terminal, C-terminal, o extensiones internas, supresiones o inserciones en la secuencia del anticuerpo afecta a la identidad u homología de la secuencia. La variante retiene la capacidad de unirse a un esfingolípido y preferentemente tiene actividades deseadas que son superiores a las del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, una mayor capacidad para reducir la angiogénesis y/o detener la progresión del tumor. Para analizar dichas propiedades deseadas (por ejemplo, menos inmunogénico, vida media más larga, mayor estabilidad, potencia mejorada), se debería comparar una forma Fab de la variante con una forma Fab del anticuerpo precursor o una forma de longitud completa de la variante con una forma de longitud completa del anticuerpo recursos, por ejemplo, ya que se ha encontrado que el formato de los anticuerpos anti-esfingolípidos influye en su actividad en los ensayos de actividad biológica que se divulgan en el presente documento. El anticuerpo variante de interés en particular en el presente documento puede ser uno que presenta al menos aproximadamente un 5 %, preferentemente al menos aproximadamente un 10 %, un 25 %, un 59 %, o más de al menos una actividad deseada. La variante preferente es una que tiene propiedades biofísicas superiores tal como se mide *in vitro* o actividades biológicas superiores tal como se mide *in vitro* o *in vivo* en comparación con el anticuerpo precursor.

En el presente documento, el anticuerpo "precursor" es uno que está codificado por una secuencia de aminoácidos usada para la preparación de la variante. Preferentemente, el anticuerpo precursor tiene una región marco conservada humana y, si está presente, tiene región o regiones constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferentes, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo tal como se determina con el procedimiento de Lowry, y más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

El término "marca" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo. La marca en sí misma se puede detectar por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopos o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que se puede detectar.

"Fase sólida" significa una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención o en la que el anticuerpo u otro reactivo de unión a anti-S1P se puede llegar a inmovilizar de otro modo. Los ejemplos de fases sólidas que se engloban en el presente documento incluyen las formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En determinadas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; mientras que en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Esta expresión también incluye una fase sólida discontinua de partículas separadas, tales como las que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4.275.149.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula formada por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-esfingolípidos que se divulgan en el presente documento y, opcionalmente, un agente quimioterapéuticos) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. Una molécula de ácido nucleico "aislado" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa a partir de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislado es distinta en la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aislado se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida de forma operativa en un organismo huésped en particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

5 El ácido nucleico se "une operativamente" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia previa o líder secretor se une operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una proteína previa que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se une operativamente a una secuencia de codificación si se coloca con el fin de facilitar la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las moléculas de ácido nucleico que se están uniendo son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante la unión en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, los adaptadores o engarces de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

15 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las denominaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y cultivos derivados de éstas sin tener en cuenta el número de transferencias. Además, se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la identificada sistemáticamente en la célula transformada originalmente. Cuando se pretenden denominaciones distintas, será evidente a partir del contexto.

Una composición "patentable", procedimiento, máquina, o artículo de fabricación de acuerdo con la invención significa que la materia objetivo satisface todos los requisitos legales de patentabilidad en el momento en el que se realiza el análisis. Por ejemplo, con respecto a la novedad, no evidencia, o similares, si la investigación posterior revela que una o más reivindicaciones incluye una o más de realizaciones que podrían anular la novedad, no evidencia, etc., la reivindicación o reivindicaciones, quedando limitadas por definición a realizaciones "patentables", excluyen específicamente la realización o realizaciones no patentables. Además, las reivindicaciones adjuntas a la presente se deben interpretar tanto para proporcionar el alcance más amplio razonable, así como para conservar su validez. Además, las reivindicaciones se deben interpretar de una manera que (1) conserva su validez y (2) ofrece la más amplia interpretación más amplia razonable en las circunstancias, si se modifica uno o más de los requisitos legales de patentabilidad o si las normas cambian para evaluar si se cumple un requisito jurídico en particular de patentabilidad a partir del momento en el que se presenta esta solicitud o se expide como una patente en un momento en el que se cuestiona la validez de una o más de las reivindicaciones adjuntas.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los agentes y compuestos de la presente invención y que no son biológicamente o de otra forma indeseables. En muchos casos, los agentes y los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácido y/o base debido a la presencia de grupos cargados, por ejemplo, grupos amino y/o carboxilo cargados o grupos similares a los mismos. Las sales de adición de ácida farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos, mientras que las sales de adición básica farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Para una revisión de sales farmacéuticamente aceptables (véase Berge, y col. (1977) J. Pharm. Sci., vol. 66, 1-19).

Una "pluralidad" significa más de uno.

Los términos "separados", "purificados", "aislados", y similares significan que uno o más componentes de una muestra contenida en un recipiente que mantiene muestras son o se han retirado físicamente de, o diluido en presencia de uno u otros componentes más de la muestra presentes en el recipiente. Los componentes de la muestra que se pueden retirar o diluir durante una etapa de separación o purificación incluyen, productos de reacción química, productos químicos sin reaccionar, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, y moléculas sin unir.

El término "especie" se usan en el presente documento en diversos contextos, por ejemplo, una especie de agente quimioterapéutico en particular. En cada contexto, el término se refiere a una población de moléculas químicamente indistinguibles del tipo que se menciona en el contexto en particular.

"Asociar específicamente" y "asociación específica" y similares se refieren 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 interacciones químicas o moleculares apropiadas entre las moléculas.

Un "sujeto" o "paciente" se refiere a un animal con necesidad de tratamiento que se puede realizar con moléculas de la invención. Los animales que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen vertebrados, siendo los animales mamíferos tales como bovinos, caninos, equinos, felinos, ovinos, porcinos y primates (incluyendo seres humanos y primates no humanos), los ejemplos particularmente preferentes.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o "cantidad eficaz") se refiere a una cantidad de un principio activo, por

ejemplo, un agente de acuerdo con la invención, suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un sujeto o paciente. Por consiguiente, un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la invención. En el contexto de la terapia ocular, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que produce un cambio medido objetivamente en uno o más parámetros asociados con el tratamiento de la enfermedad o afección ocular incluyendo un aumento o disminución en la expresión de uno o más genes correlacionados con la enfermedad o afección ocular, inducción de apoptosis u otras rutas de muerte celular, mejoría clínica de los síntomas, una disminución de la neovascularización anómala o de la inflamación, etc. Por supuesto, la cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y la afección en particular que se está tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la patología, el compuesto elegido en particular, el régimen de dosificación a seguir, momento de administración, la forma de administración y similares, todo lo cual lo puede determinar fácilmente un experto habitual en la materia. Se observará que en el contexto de la terapia de combinación, lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de un principio activo en particular puede diferir de lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo cuando se administra como una monoterapia (es decir, un régimen terapéutico que usa solamente una entidad química como el principio activo).

El término "tratamiento" o "que trata" una enfermedad o trastorno incluye la prevención o la protección frente a la enfermedad o trastorno (es decir, que hace que los síntomas clínicos no se desarrollen); inhibición de la enfermedad o trastorno (es decir, detención o supresión del desarrollo de los síntomas clínicos, y/o alivio de la enfermedad o trastorno (es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos). Tal como se observará, no siempre es posible distinguir entre "prevención" y "supresión" de una enfermedad o trastorno dado que el último suceso o sucesos inductores pueden ser desconocidos o latentes. Por consiguiente, se entenderá que el término "profilaxis" constituye un tipo de "tratamiento" que incluye tanto "prevención" como "supresión". Por lo tanto, el término "tratamiento" incluye "profilaxis".

La expresión "régimen terapéutico" significa cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno que usa fármacos quimioterapéuticos, terapia de radiación, cirugía, terapia genética, vacunas y terapia de ADN, terapias en base antisentido incluyendo terapia de ARNsi, terapia antiangiogénica, inmunoterapia, trasplantes de médula ósea, aptámeros y otros agentes biológicos tales como anticuerpos y variantes de anticuerpo, señuelos de receptores y otros agentes terapéuticos basados en proteínas.

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a agentes anti-esfingolípidos humanizados, específicamente anticuerpos y variantes de anticuerpo anti-esfingolípido con propiedades deseables a partir de un punto de vista terapéutico y/o de diagnóstico, incluyendo una fuerte afinidad de unión por los esfingolípidos, la capacidad de unirse y neutralizar la esfingosina-1-fosfato (S1P), particularmente en contextos fisiológicos (por ejemplo, en tejido vivo, sangre, etc.) y en condiciones fisiológicas, así como isoformas, variantes, isómeros, y compuestos relacionados. En particular, la invención se refiere a anticuerpos, en particular a anticuerpos monoclonales, más particularmente anticuerpos monoclonales humanizados y variantes de los mismos, dirigidos a S1P. Dichos anticuerpos y variantes se incluyen preferentemente en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a sujetos de los que se sabe o se sospecha que necesitan tratamiento con dichos compuestos. Además de composiciones, la invención también proporciona kits que incluyen dichas composiciones, procedimientos para fabricar dichos anticuerpos y variantes anti-S1P, y usos médicos de los mismos.

La presente invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados tal como se define en la reivindicación 1 que unen esfingosina-1-fosfato (S1P) en condiciones fisiológicas.

Específicamente, los anticuerpos de la invención comprenden dos polipéptidos de cadena ligera y dos polipéptidos de cadena pesada. En esta realización cada polipéptido de cadena ligera comprende la primera, segunda, y tercera regiones que determinan la complementariedad CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, en la que CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos ITTTDIDDDMN (SEC ID N°: 10); CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos EGNILRP (SEC ID N°: 11); y CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos LQSDNLPFT (SEC ID N°: 12). Además, cada polipéptido de cadena pesada comprende la primera, segunda, y tercera regiones que determinan la complementariedad CDRH1, CDRH2, y CDRH3, respectivamente, en el que CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos DHTIH (SEC ID N°: 13); CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos AISPRHDITKYNEMFRG (SEC ID N°: 31); y CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos GGFYGGSTIWFDF (SEC ID N°: 15).

Los fragmentos de anticuerpos de la invención tienen un sitio de unión antígeno único y comprenden un polipéptido de cadena ligera o fragmento del mismo y un polipéptido de cadena pesada o fragmento. En esta realización, el fragmento o polipéptido de cadena ligera del mismo comprende la primera, segunda, y tercera regiones que determinan la complementariedad CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, en el que CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos ITTTDIDDDMN (SEC ID N°: 10); CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos EGNILRP (SEC ID N°: 11); y CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos LQSDNLPFT (SEC ID N°: 12).

Además, el polipéptido de cadena pesada o fragmento del mismo comprende la primera, segunda, y tercera regiones que determinan la complementariedad CDRH1, CDRH2, y CDRH3, respectivamente, en el que CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos DHTIH (SEC ID N°: 13); CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos

AISPRHDITKYNEMFRG (SEC ID N°: 31); y CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos GGFYGSTIWFD (SEC ID N°: 15). Las tres CDR de cadena ligera se injertan en una región marco de cadena ligera humana que contiene las tres mutaciones siguientes en la secuencia de murino: Y49S, G64S, y S67Y, y las tres CDR de cadena pesada se injertan en una región marco de cadena pesada humana que contiene la siguiente mutación en la secuencia de murino V37M, en la que la región marco de cadena ligera humana este anticuerpo AY050707 humano y la región marco de cadena pesada humana es de anticuerpo AJ002773 humano.

5

En una realización específica, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado aislado de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de restos de aminoácidos que tienen una secuencia de aminoácidos:

**EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSFYIFIDHTIHWMRQMPGQGLEWM
GAISPRHDITYNEMFRGQVTISADKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYFCAR
GGFYGSTIWFDWVGQGMVTVSS**

10

o una secuencia de restos de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 % con esta secuencia de aminoácidos. Además, este anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado aislado comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tienen la secuencia de aminoácidos:

**ETTVTQSPSFLSASVGDRVITICITTTDIDDDMNWFQQEPG
KAPKLLISEGNILRPGVPSRFSSSGYGTDFTLTISKLQPEDF
ATYYCLQSDNLPFTFGQG
TKLEIK**

15

TKLEIK o una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 % con esta secuencia de aminoácidos.

En una realización específica adicional de la invención, la cadena o cadenas pesadas del anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado aislado comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en:

20

**EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSFYIFIDHTIHWMRQMPGQGLE
WMGAISPRHDITKYNEMFRGQVTISADKSSSTAYLQWSSLKASDTAM
YFCARGGFYGSTIWFDWVGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK ,**

en la que el resto de K (lisina) C-terminal es opcional;

o una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 % con esta secuencia de aminoácidos; y la cadena o cadenas ligeras del anticuerpo o fragmento de anticuerpos comprende a una secuencia de restos de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en:

25

ETTVTQSPSFLSASVGDRTTITCITTTDIDDDMNWFQEPGKAPKL
 LISEGNILRPGVPSRFSSSGYGTDFTLTISKLQPEDFATYYCLQSDNLPFT
 FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYA
 CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC ;

o una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 % con esta secuencia de aminoácidos.

5 El anticuerpo aislado de la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo maduro de afinidad. El fragmento de anticuerpo aislado de la invención se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un fragmento de Fv, un fragmento de Fv de una sola cadena, un fragmento de Fab, y un fragmento de Fab'.

10 En otra realización específica de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado tiene un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia codificada por el gen de cadena pesada en el vector pATH1009 en StB12 de *E. coli*, depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° PTA-8421 de Acceso de la ATCC, y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia codificada por el gen de cadena ligera en el vector pATH1009 en StB12 de *E. coli*, depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° PTA-8421 de Acceso de la ATCC.

15 Otra realización de la invención es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado que tiene un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia codificada por el gen de cadena pesada en el vector pATH1009 en la línea celular LH1 275 de CHO, depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° PTA-8422 de Acceso de la ATCC; y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia codificada por la cadena ligera en el vector pATH1009 en la línea celular LH1 275 de CHO, depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° PTA-8422 de Acceso de la ATCC.

20 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de la invención puede contener adicionalmente un sitio de glicosilación.

La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable así como un artículo que comprende esta composición farmacéutica envasada en un recipiente, y que además comprende opcionalmente instrucciones de uso.

25 En la presente invención también se incluye una composición de ácido nucleico aislado que codifica la expresión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, en la que la composición comprende un primer casete de expresión que comprende un promotor y un gen que codifica el polipéptido polipéptidos de cadena pesada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y un segundo casete de expresión que comprende un promotor y un gen que codifica el polipéptido o polipéptidos de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Esta composición de ácido nucleico puede comprender un plásmido que comprende el primer y segundo casetes de expresión.

30 Además, la invención también incluye una célula huésped recombinante transfectada con la composición de ácido nucleico aislado de la invención que es capaz de expresar dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Además, la invención incluye un procedimiento para producir un anticuerpo de la invención, que comprende cultivar una célula huésped recombinante capaz de producir el anticuerpo en un medio de cultivo celular y aislar el anticuerpo.

35 Por último, la invención incluye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto, en el que dicha enfermedad o trastorno se correlaciona con un nivel anómalo de S1P. Esta enfermedad o trastorno se puede caracterizar, al menos en parte, por neovascularización, angiogénesis, proliferación de células endoteliales, fibrogénesis, fibrosis, cicatrización, inflamación, o respuesta inmune anómalas.

40 Además se describen cadenas pesadas y cadenas ligeras de anticuerpo anti-S1P aislados que comprenden dominios variables de secuencias preferentes recién identificadas, en particular se proporciona SEC ID N°: 27 y SEC ID N°: 35 para las cadenas pesadas y SEC ID N°: 30 y SEC ID N°: 37 para las cadenas ligeras. Además, se describen agentes anti-S1P que son reactivos frente a la esfingosina-1 fosfato (S1P) en condiciones fisiológicas y que comprenden al menos un péptido de CDR que tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos un 50 %, y hasta e incluyendo una identidad de un 100 %, con las secuencias de CDR especificadas en cualquier parte en el presente documento.

45 Se divulga un anticuerpo anti-esfingolípido que tiene un dominio variable de cadena ligera que comprende 20 regiones que determinan la complementariedad hipervariables (CDR) con las secuencias de aminoácidos siguientes:

ITTTDIDDDMN (SEC ID N°: 10; CDRL1), EGNILRP (SEC ID N°:11; CDRL2) y LQSDNLPFT (SEC ID N°: 12; CDRL3). Preferentemente, el dominio variable de cadena pesada comprende las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos DHTIH (SEC ID N°: 13; CDRH1), GGFYGSTIWFDF (SEC ID N°: 15; CDRH3) y CISPRHDITKYNEMFRG (SEC ID N°: 14; CDRH2) o AISPRHDITKYNEMFRG SEC ID N°: 31; CDRH2). Aquí, la una o más de las CDR se injerta o injertan en una región marco de una forma tal que las CDR retiene su capacidad para unir y neutralizar S1P. Sin quedar limitada al siguiente ejemplo, la región del marco podría 30 representar la secuencia humana de cadenas ligera y pesada de un anticuerpo que flanquea inmediatamente las CDR, pero también podría representar cualquier estructura que presenta las CDR de una forma tal que optimiza as características da rendimiento del anticuerpo humanizado en su unión a la S1P o en otras características que aumentan la potencia, estabilidad, expresión, vida media biológica, solubilidad, inmunogenicidad, distribución farmacológica, y vida media del anticuerpo.

Además, se describe una realización en la que se proporcionan las tres regiones CDR hipervariables de cadena pesada en una región marco conservada humana, por ejemplo, como una secuencia contigua representada con la siguiente fórmula: FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4.

Además se divulga un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo anti-esfingolípido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en el presente documento por la SEC ID N°: 27. Una secuencia de dominio variable de cadena pesada particularmente útil es la del anticuerpo humanizado que se describe en el Ejemplo 12, que sigue a continuación, y comprende la secuencia de dominio variable de cadena pesada de SEC ID N°: 32. Dichas secuencias de dominio variable de cadena pesada se pueden combinar con, por ejemplo, un polipéptido que comprende la secuencia de dominio variable de cadena ligera representada en el presente documento por la SEC ID N°: 33, o con otras secuencias de dominio variable de cadena ligera, con la condición de que la molécula resultante se una a un esfingolípido.

Además, se describe un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo anti-esfingolípido humanizado que comprende la secuencia de aminoácidos representada en el presente documento por SEC ID N°: 17. Una secuencia de dominio variable de cadena ligera útil es la del anticuerpo humanizado del Ejemplo 12, que sigue a continuación, y comprende la secuencia de dominio variable de cadena ligera de la SEC ID N°: 30 o de la SEC ID N°: 37.

Se divulga un anticuerpo anti-esfingolípido humanizado que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 37 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 35.

El dominio variable de cadena ligera puede comprender regiones hipervariables con las secuencias de aminoácidos siguientes: CDRL1 (SEC ID N°: 10), CDRL2 (SEC ID N°: 11), y CDRL3 (SEC ID N°: 12). Las tres regiones hipervariables de cadena ligera se describen en una región marco conservada humana, por ejemplo, como una secuencia contigua representada con la siguiente fórmula: FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CD-RL3-FR4.

Además se divulgan variantes de anticuerpos anti-esfingolípidos precursores, preferentemente en las que el anticuerpo precursor es un anticuerpo anti-esfingolípido humanizado o humano. Dichas variantes se unen a un esfingolípido, en particular a S1P, y comprenden una sustitución de aminoácido en una región hipervariable del dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo anti-esfingolípido precursor. Dicha variante tiene preferentemente una o más sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo anti-esfingolípido. De acuerdo con una realización, la sustitución o sustituciones se producen en el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la sustitución o sustituciones de aminoácidos se pueden producir en la CDRH1 y/o CDRH3 del dominio variable de cadena pesada. Pueden existir sustituciones en ambas de estas regiones hipervariables. En el presente documento se demuestra que dichas variantes "maduras por afinidad" se unen a esfingolípidos más fuertemente que el anticuerpo anti-esfingolípido precursor a partir del que se generaron. Por ejemplo, un anticuerpo producido por la maduración por afinidad puede tener un valor de K_d que es significativamente inferior al del anticuerpo anti-esfingolípido precursor.

Un ejemplo representativo de maduración por afinidad implica la alteración de regiones marco de cadena ligera y pesada kappal de IgG humana en las que se injertaron CDR anti-S1P de murino. Esto dio como resultado una mayor afinidad del anticuerpo humanizado frente a su ligando diana, es decir, S1P. En otras realizaciones, una o más de las CDR podrían ser soportadas por las secuencias de aminoácidos distintas de las regiones marco de IgG humana. Se puede realizar maduración por afinidad mediante la alteración de la secuencia o secuencias de aminoácidos en las regiones CDR hipervariables para mejorar el rendimiento y/o las características del anticuerpo que se han descrito anteriormente. Un ejemplo de esta forma de maduración por afinidad se muestra en el Ejemplo 12, que sigue a continuación, en el proceso de cisteína en una CDR de cadena pesada se cambió por mutagénesis dirigida al sitio en un resto de alanina, dando como resultado un aumento sustancial en la afinidad de unión a S1P y la estabilidad. Se divulga una de dichas variantes de cadena pesada, en la que la región variable incluía la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 27. Dichas secuencias de dominio variable de cadena pesada en CDRH2 se pueden combinar opcionalmente con un dominio variable de cadena ligera, por ejemplo, una variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17, o preferentemente la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de la SEC ID N°:30.

En el presente documento se contemplan diversas moléculas anti-S1P. Por ejemplo, el agente anti-S1P puede ser un

anticuerpo o un derivado de anticuerpo. Por ejemplo, el agente anti-S1P puede ser un anticuerpo, incluyendo un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región Fc humana intacta) o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, una molécula de Fab, Fab', o F(ab')₂), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, o un anticuerpo madurado por afinidad. Sin limitar la invención, se pueden producir dichos agentes anti-S1P para mejorar o de otro modo alterar la estabilidad, vida media, potencia, distribución farmacológica, y/o inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un dominio Fc humanizado se podría alterar en su composición de aminoácidos para mejorar su inmunogenicidad u otras características de rendimiento.

En otras realizaciones, el agente anti-S1P se puede conjugar con un resto tal como un polímero, un radionúclido, un agente quimioterapéutico, y un agente de detección.

En determinadas realizaciones preferentes, el agente anti-S1P se formula con un vehículo tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el agente anti-S1P se combina con un segundo agente tal como un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un derivado de anticuerpo, una variante de anticuerpo, un agente terapéutico distinto de un agente anti-S1P, o un agente que se puede unir a una molécula distinta de S1P.

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico aislado que codifican los diversos componentes de anticuerpos, variantes de anticuerpo, y fragmentos de acuerdo con la invención, incluyendo diversas secuencias de cadena pesada y ligera y las CDR. Además, se proporcionan vectores y células huésped que contienen estas moléculas de ácido nucleico. Además se proporcionan polipéptidos aislados que comprenden una o más de las secuencias de aminoácidos preferentes, tales como secuencias de CDR o secuencias de cadena ligera y/o pesada de anticuerpos.

En realizaciones preferentes de la invención, se proporcionan moléculas de anticuerpo aislado que contienen secuencias de CDR definidas de forma precisa en cada cadena pesada y en cada cadena ligera. En una de dichas realizaciones, la molécula de anticuerpo aislado es una molécula de anticuerpo humanizado.

Además, se divulgan moléculas polivalentes que tienen un elemento de unión a ligandos que es reactivo con S1P y que contiene una o más de las secuencias de CDR preferentes. Estas moléculas polivalentes pueden contener al menos uno, y hasta 10.000 o más, elementos de unión a ligandos que son reactivos con S1P. Además, si se desea, se pueden incluir elementos reactivos de unión a ligandos que reaccionan con un ligando diferente, del mismo modo que se pueden incluir diferentes especies de elementos de unión a ligandos cada una reactiva con S1P, pero que difieren de otros elementos de unión a S1P en una o más características (por ejemplo, estructura molecular, afinidad de unión, etc.).

Además, se proporcionan usos de los anticuerpos o fragmentos de la invención en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos relacionados con niveles anómalos, en particular niveles elevados de S1P. En general, dichos usos comprenden administrar a un sujeto, tal como un ser humano, con necesidad de dicho tratamiento una de las composiciones anti-S1P de la invención. Las enfermedades o trastornos susceptibles de tratamiento con dichos procedimientos incluyen cáncer, trastornos inflamatorios, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades cardiovasculares, trastornos oculares, enfermedades y trastornos asociados con fibrogénesis excesiva, y enfermedades o trastornos asociados con angiogénesis patológica. Las composiciones anti-S1P también se pueden administrar en combinación con otro agente terapéutico o régimen terapéutico.

Un aspecto relacionado se refiere a procedimientos para reducir la toxicidad de un régimen terapéutico para el tratamiento o prevención de un trastorno hiperproliferativo. Dichos usos comprenden administrar a un sujeto que padece un trastorno hiperproliferativo una cantidad eficaz de un agente (o una pluralidad de especies de agente diferentes) de acuerdo con la invención antes, durante o después de la administración de un régimen terapéutico destinado a tratar o prevenir el trastorno hiperproliferativo. En una realización preferente, el anticuerpo y el régimen terapéutico tienen efectos aditivos, y la adición del anticuerpo al régimen terapéutico puede permitir la reducción de la dosis del régimen terapéutico, reduciendo de este modo la toxicidad asociada al tratamiento.

Además, se divulgan usos de diagnóstico para los agentes anti-S1P de la invención. En una aplicación de diagnóstico, la invención proporciona procedimientos para determinar la presencia en una muestra de un esfingolípido diana. En general, dichos procedimientos se realizan mediante la exposición de una muestra (tal como una muestra de biopsia de fluido o tejido corporal) que se sospecha que contiene un esfingolípido en particular (es decir, el esfingolípido "diana") a un agente anti-S1P tal como un anticuerpo anti-esfingolípido de la invención y la determinación de si existe un nivel anómalo (es decir, un nivel asociado o correlacionado con una enfermedad, afección o trastorno) del esfingolípido diana (por ejemplo, S1P) en la muestra. Para determinadas de estas aplicaciones, se proporcionan kits que contienen el anticuerpo e instrucciones para su uso.

Además otro aspecto de la invención se refiere a procedimientos para fabricar un agente anti-S1P. Los ejemplos preferentes de dichos agentes incluyen anticuerpos, variantes de anticuerpos, y derivados de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos). En realizaciones preferentes, particularmente las que se refieren a agentes anti-S1P que comprenden uno o más polipéptidos, son precedentes los sistemas biológicos de producción, tales como líneas celulares. Por supuesto, también se pueden usar procedimientos de química sintética.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se analizan con mayor detalle en las secciones que siguen a

continuación. Los aspectos anteriores y otros aspectos de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos adjuntos, y las reivindicaciones.

Breve Descripción de las Figuras

5 La presente solicitud contiene al menos una figura realizada en color. Las copias de la presente solicitud con figura o figuras en color se proporcionarán a petición y pago de la tasa necesaria. A continuación se proporciona un breve resumen de cada una de las figuras.

10 **Figura 1.** La Figura 1 tiene dos paneles, A y B. El Panel A ilustra gráficamente los resultados de un ELISA competitivo para S1P, SPH, LPA, SPC, y otros lípidos estructuralmente similares que compiten por un anticuerpo monoclonal anti-S1P conjugado con biotina. Estos resultados indican que el anticuerpo es específico y sensible para S1P y no reconoce lípidos bioactivos estructuralmente similares. Tal como se describe en el Ejemplo 1, que sigue a continuación, se detectó anticuerpo unido mediante un segundo anticuerpo, específico para la IgG de ratón o humana, conjugado con HRP. Se midieron las reacciones cromogénicas y se indicaron como densidad óptica (DO). La concentración de lípidos usada para la competición se indica en el eje X. No se pudo detectar interacción del anticuerpo secundario con solamente con matriz revestida con S1P (no se muestran los datos). El Panel B muestra las estructuras de los lípidos bioactivos similares a S1P que se enumeran en el Panel A.

15 **Figura 2.** Esta figura muestra las propiedades de unión de varias variantes de anticuerpos anti-S1P humanizados quiméricos y recombinantes. La unión a S1P para un anticuerpo quimérico (pATH10 + pATH50) se comparó en un ensayo de unión de ELISA a dos versiones del anticuerpo monoclonal anti-S1P humanizado (pATH201 + pATH308) y (pATH201 + pATH309). pATH308 es la cadena ligera humanizada con cinco retromutaciones de murino y pATH309 es la cadena ligera humanizada con tres retromutaciones en la región marco conservada. La cadena pesada humanizada (pATH201) contiene solamente una retromutación de murino en la región marco conservada.

20 **Figura 3** es un gráfico que muestra que SPHINGOMAB es altamente específico para S1P. El gráfico, los datos para los que se generaron usando un ELISA competitivo, demuestra la especificidad de SPHINGOMAB por S1P en comparación con otros lípidos bioactivos. SPHINGOMAB no demostró reactividad cruzada con esfingosina (SPH), el precursor metabólico inmediato de S1P o del ácido lisofosfatídico (LPA), una molécula de señalización extracelular importante que es estructural y funcionalmente similar a la S1P. SPHINGOMAB no reconoció otros lípidos y metabolitos estructuralmente similares, incluyendo ceramida-1-fosfato (C1P), dihidroesfingosina (DH-SPH), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) o esfingomielina (SM). SPHINGOMAB sí produjo reacción cruzada con dihidroesfingosina-1-fosfato (DH-S1P) y, en menor medida, con esfingosilforicolina (SPC). La afinidad (Kd) de SPHINGOMAB por S1P es menor que 100 pM, mucho mayor que la de la mayoría de los anticuerpos terapéuticos, en particular otras esponjas moleculares.

25 **Figura 4.** La Figura 4 tiene dos partes, A and B. los experimentos que dan lugar a los datos representados en esta Figura se detallan en el Ejemplo 4, que sigue a continuación. en resumen, estos datos muestran que SPHINGOMAB redujo la CNV y la formación de cicatrices en lesiones oculares. Los ratones se trataron con SPHINGOMAB o un anticuerpo monoclonal no específico del mismo isotipo. Se indujeron lesiones CNV mediante rotura por láser de la membrana de Bruch. Se muestran gráficos e imágenes representativas de lesiones de cada grupo de tratamiento teñidas con aglutinina I para la vascularización (A) o tricromo de Masson para la formación de cicatrices en colágeno (B). La Figura 4A muestra que en un modelo que formación de lesión, SPHINGOMAB atenúa espectacularmente la neovascularización coroidea 14 y 28 días después de la rotura de la membrana de Bruch inducida por láser. La Figura 4B muestra que SPHINGOMAB reduce significativamente la fibrosis asociada con la formación de lesiones de CNV 28 días después de la rotura de la membrana de Bruch inducida por láser.

30 **Figura 5.** La Figura 5 tiene dos paneles, A y B. En el panel A, se muestra que S1P promueve la neovascularización a través de la inducción de formación y migración de tubos HUVEC, que se ve reducida por SPHINGOMAB. El panel 5A muestra cuatro micrografías de HUVEC sembradas en Matrigel e incubadas durante 6 horas para evaluar la formación de tubos h. El panel 5B muestra datos para las HUVEC que se trataron con S1P 1 μ M \pm SPHINGOMAB (1 μ g/ml) durante 6 horas en una cámara de invasión en Matrigel. Se hizo el recuento del número de células que migraron a la membrana de Matrigel en cinco campos independientes.

35 **Figura 6.** La Figura 6 contiene varias fotografías (A) y gráficos (B y C) para experimentos que se describen en Ejemplo, 6, que sigue a continuación, que se realizaron usando SPHINGOMAB. SPHINGOMAB neutraliza la neovascularización inducida por S1P, VEGF y bFGF. La Figura 6A muestra fotografías de varios vasos sanguíneos representativos teñidos con FITCa partir de secciones de tapones de Matrigel \pm los factores de crecimiento indicados. La Figura 6B muestra que S1P estimula la infiltración de células endoteliales (EC). La Figura 6C representa la cuantificación de fluorescencia relativa a partir de tapones de Matrigel estimulados con VEGF o bFGF como un indicador de neovascularización. Los efectos de S1P, VEGF, y bFGF se inhibieron cuando los ratones se

55

trataron por vía sistémica con 1 o 25 mg/kg de SPHINGOMAB.

Figura 7. La Figura 7 muestra 5 gráficos, marcados como A-E, y dos fotografías en color. Estos datos se generaron usando el anticuerpo monoclonal anti-S1P SPHINGOMAB. Véase el Ejemplo 7, que sigue a continuación, para detalles experimentales. En resumen, estos datos muestran que SPHINGOMAB neutraliza la formación de cicatrices estimulada por S1P. en estos experimentos, los fibroblastos se dejaron sin suero y a continuación se trataron con S1P 0, 0,1, 0,5, o 1 μ M +/- 1 μ g/ml de SPHINGOMAB durante 12-24 h. Los datos muestran que la proliferación de fibroblastos Swiss 3T3 estimulada con S1P, tal como se mide mediante la incorporación de 3H-timidina (A), la migración de fibroblastos cardíacos de murino en un ensayo de raspado (B), la expresión genética de colágeno (fluorescencia relativa) en fibroblastos cardíacos aislados a partir de ratones transgénicos que expresan colágeno-GFP (C), y la diferenciación de células WI-38 en miofibroblastos tal como se mide mediante la disminución de la proliferación celular y el aumento de la expresión de α -SMA (D). SPHINGOMAB neutralizó cada uno de estos efectos de S1P. SPHINGOMAB redujo la fibrosis perivascular *in vivo* en un modelo de murino de un infarto de miocardio permanente (E).

Figura 8. La Figura 8 tiene tres paneles, 8A, 8B, y 8C. Estos datos muestran que S1P estimula la transformación de células epiteliales oculares y fibroblastos en miofibroblastos productores de tejido cicatricial, contráctil. Tal como se describe en el Ejemplo 8, que sigue a continuación, se examinaron los efectos de la S1P en la transformación de los miofibroblastos de varias líneas celulares oculares humanas. Se descubrió que la S1P estimulaba la producción de actina de Músculo liso α (α -SMA; un marcador de miofibroblastos) en células epiteliales pigmentarias retinianas humanas (Figura 8A) y fibroblastos de conjuntiva humana (Figura 8B). Estos datos demuestran, por primera vez, que la S1P está entre los factores que estimulan la transformación de las células epiteliales oculares y los fibroblastos en miofibroblastos productores de tejido cicatricial, contráctil. Además, se examinaron los efectos de la S1P en la expresión del inhibidor del activador de plasminógenos (PAI-1) en fibroblastos de la conjuntiva humana. El aumento de la expresión de PAI-1 se correlaciona con una disminución de la degradación proteolítica del tejido conjuntivo y se regula de forma positiva en asociación con varias enfermedades fibróticas que implican un aumento de la cicatrización. Tal como se muestra en la Figura 8C, la S1P estimula la expresión de PAI-1 de un modo dependiente de la dosis.

Figura 9. La Figura 9 muestra datos gráficos de barras, A y B, que muestran los datos experimentales generados usando un anticuerpo monoclonal anti-S1P denominado SPHINGOMAB. SPHINGOMAB redujo la infiltración *in vivo* de células inmunitarias en la herida. Los ratones se sometieron a MI, se trataron con solución salina o 25 mg/kg de SPHINGOMAB 48 horas después de la cirugía y después fueron sacrificados el día 4. SPHINGOMAB redujo la infiltración de macrófagos (A) y de mastocitos (B) en la herida. Los datos se representan como las veces que disminuyen los valores tratados con solución salina.

Figura 10. La Figura 10 tiene dos paneles, 10A y 10B. Cada panel muestra un mapa de un vector de clonación para la expresión de los dominios V_L y V_H de anticuerpo monoclonal anti-S1P de murino. La Figura 10A es un mapa de un vector pKN100 para la clonación del dominio V_L . La Figura 10B es un mapa de un vector pG1D200 para la clonación del dominio V_H .

Figura 11. La Figura 11 presenta datos que muestran las propiedades de unión de varios anticuerpos anti-S1P humanizados de murino, quimérico, y recombinante. La unión a S1P para ratón (muMAbSIP; curva generada a partir de puntos de datos al cuadrado) y quimérico (chMAb S1P; curva generada a partir de puntos de datos triangulares verticales) se comparó en un ensayo de unión de ELISA con el primer la primera versión del anticuerpo humanizado (pATH200 + pATH300; curva generada a partir de puntos de datos triangulares invertidos).

Figura 12. La Figura 12 tiene dos paneles, A y B, que muestran datos a partir de ensayos de células *in vitro* realizados usando varias variantes de anticuerpo monoclonal humanizado. El panel A muestra que el mAb humanizado es capaz de evitar que la S1P proteja las células SKOV3 de la apoptosis inducida por Taxol. Tal como se describe en el Ejemplo 16, que sigue a continuación, las células SKOV3 se trataron durante 48 horas con Taxol 500 nM (Tax) en presencia o ausencia de S1P 500 nM con huMAbHCLC₃ (309), huMAbHCLC₅ (308), muMAb S1P (muMAb), o IgG1 no específica (NS) a una concentración de 1 μ g/ml. los valores representan medias \pm ETM (n = 3) con ejecuciones por triplicado para cada punto de datos. "NT" significa no tratado, y "Veh" representa vehículos solo. El panel B muestra la secreción de IL-8 en células de cáncer de ovario (OVCAR3) tratadas con S1P y uno de varios los anticuerpos monoclonales anti-S1P diferentes o un anticuerpo monoclonal de control. En los experimentos que se describen con detalle en el Ejemplo 16, que sigue a continuación, 100.000 células OVCAR3/pocillo se dejaron en inanición durante una noche y se añadió S1P 1 uM al medio de cultivo solo o incubado previamente con 1 ug/ml de anticuerpo no específico (NS), pATH201 + pATH309 (LC3), pATH201 + pATH308 (LC5), pATH207 + pATH309 (cysLC3), pATH207 + pATH308 (cysLC5), y 0,1 ug/ml (M0,1), 1 ug/ml (M1) o 10 ug/ml (M10) de anticuerpo murino anti-S 1 P. Después de 22 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes de células y se midió la secreción de IL-8 con ELISA usando un kit de CXCL8/IL-8 humano Quantikine de R&D systems. En la figura "NT" se refiere a células sin tratar.

Figura 13. La Figura 13 muestra la eficacia *in vivo* de varias variantes de anticuerpo monoclonal humano en comparación con un anticuerpo monoclonal anti-S1P de ratón y controles en un modelo animal de CNV. Tal como se describe en el Ejemplo 17, que sigue a continuación, en estos experimentos, se administró a los ratones 0,5 ug dos veces (día 0 y día 6) de un anticuerpo monoclonal anti-S1P de murino (Mu), varias variantes de anticuerpo monoclonal anti-S1P humanizado (es decir, las variantes LC3, LC5, HCcysLC3, y HCcysLC5), o un anticuerpo monoclonal no específico (NS) mediante administración intravítrea y a continuación se sometió a rotura de la membrana de Bruch con láser. Los ratones sacrificaron 14 días después de la cirugía con láser. Se diseccionaron complejos de esclerótica-RPE-coroides y se tñeron con un anticuerpo de aglutinina I de *R. communis* conjugado con Rodamina. Los volúmenes de la lesión de CNV se representan como la media \pm ETM.

10 **Descripción detallada de la invención**

1. Compuestos.

La presente invención describe determinados agentes anti-S1P, en particular los que son restos derivados inmunitarios, que incluyen anticuerpos, que son específicamente reactivos con el lípido bioactivo S1P; en otras palabras, el lípido bioactivo con el que reacciona el agente anti-S1P es S1P.

Las moléculas de anticuerpo o inmunoglobulinas son grandes moléculas glicoproteicas con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, normalmente compuestas por dos tipos diferentes de cadena de polipéptidos. Una cadena de polipéptidos, denominada la cadena "pesada" (H) es de aproximadamente 50 kDa. El otro polipéptido, denominado la cadena "ligera" (L) es de aproximadamente 25 kDa. Cada molécula de inmunoglobulina consiste normalmente en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por puentes disulfuro, cuyo número varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente. En cualquier molécula dada de anticuerpo natural, las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras son idénticas, alojan dos sitios de unión a antígeno idénticos y, por lo tanto, se dice que son divalentes, es decir que tienen la capacidad de unirse de forma simultánea a dos moléculas idénticas.

Las cadenas "ligeras" de las moléculas de anticuerpo de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, kappa (κ) y lambda (λ) en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. La relación de los dos tipos de cadena ligera varía de una especie a otra. A modo de ejemplo, la relación media de κ a λ es de 20:1 en ratones, mientras que en seres humanos es de 2:1 y en ganado vacuno es de 1:20.

Las "cadenas pesadas" de las moléculas de anticuerpo de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de cinco tipos claramente distintos, denominados isotipos, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Algunos isotipos tienen varios subtipos. Las cinco clases principales de inmunoglobulina 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 difieren en los anticuerpos de diferentes isotipos, lo que determina de este modo sus propiedades funcionales. Sin embargo, la organización global de los dominios es similar en todos los isotipos.

La expresión "región variable" se refiere a la porción N-terminal de la molécula de anticuerpo o un fragmento de la misma. En general, cada una de las cuatro cadenas tiene una región variable (V) en su porción amino terminal que contribuye al sitio de unión a antígeno y una región constante (C) que determina el isotipo. Las cadenas ligeras se unen a las cadenas pesadas por muchas interacciones no covalentes y por puentes disulfuro y las regiones V del par de cadenas pesada y ligera en cada rama de la molécula de anticuerpo para generar dos sitios de unión a antígeno idénticos. Se cree que algunos restos de aminoácidos forman una superficie de contacto entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada [véase Kabat, y col. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. y Clotia y col. (1985), *J. Mol. Biol.*, vol 186: 651].

Es importante indicar que la variabilidad no se distribuye de forma uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos, sino que se concentra en tres segmentos denominados "regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o "regiones hipervariables" en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan "región marco conservada" (FR). Cada dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprende cuatro regiones FR conectadas por tres CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen en estrecha proximidad por las regiones FR y con las CDR de las otras cadenas forman el sitio de unión al antígeno de los anticuerpos [véase Kabat, y col. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, Md.]. En conjunto, las 6 CDR contribuyen a las propiedades de unión de la molécula de anticuerpo por el antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv, que solo comprende tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno [véase Pluckthun (1994), en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315].

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 se ven implicados directamente en las propiedades de unión de una molécula de anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la

toxicidad celular dependiente del anticuerpo. En el presente documento, "funciones efectoras" se refiere a los diferentes efectos fisiológicos de los anticuerpos (por ejemplo, opsonización, lisis celular, desgranulación de mastocitos, basófilos y eosinófilos, y otros procesos) mediados por el reclutamiento de células inmunitarias por la interacción molecular entre el dominio Fc y las proteínas del sistema inmune. El isotipo de la cadena pesada determina las propiedades funcionales del anticuerpo. Sus propiedades funcionales distintivas son transmitidas por las porciones en el extremo carboxi de las cadenas pesadas, en las que no están asociadas con las cadenas ligeras.

Tal como se usa en el presente documento, "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto que incluye el sitio de unión a antígeno o las regiones variables de un anticuerpo intacto, en el que la porción puede carecer de los dominios constantes de la cadena pesada (por ejemplo, CH2, CH3, y CH4) de la región Fc del anticuerpo intacto. Como alternativa, las porciones de los dominios constantes de la cadena pesada (por ejemplo, CH2, CH3, y CH4) se pueden incluir en el "fragmento de anticuerpo". Ejemplos de fragmentos de anticuerpos son aquéllos que conservan la unión a antígeno e incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, triacuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias (sc-Fv), minicuerpos, nanocuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. A modo de ejemplo, un fragmento Fab también contiene el dominio constante de una cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada.

El término "variante" se refiere a una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos nativa de un anticuerpo en al menos un resto o modificación de aminoácido. Una secuencia de aminoácidos nativa o precursora o de tipo silvestre se refiere a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo encontrado en la naturaleza. "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 la región hipervariable o CDR, 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 epítipo diana. Las moléculas de anticuerpo se pueden someterá ensayo por su especificidad de unión comparando la unión del anticuerpo al antígeno deseado para unirse al anticuerpo con antígeno no relacionado o un antígeno análogo o una mezcla de antígenos en un conjunto dado de condiciones. Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención carecerá de unión significativa a antígenos no relacionados, o incluso análogos del antígeno diana. En el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula reconocida y unida por una molécula de anticuerpo o resto derivado inmunitario que se une al antígeno. La porción específica de un antígeno que se une a un anticuerpo se denomina "epítipo". Un "hapteno" se refiere a una molécula pequeña que puede, en la mayoría de las circunstancias, provocar una respuesta inmune (es decir, actuar como un antígeno) únicamente cuando según en a una molécula vehículo, por ejemplo una proteína, polietilenglicol (PGE), oro coloidal, perlas de silicona y similares. El vehículo puede ser uno que tampoco provoca una respuesta inmune por sí solo.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio de la palabra e incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos, en los que cada rama del anticuerpo es reactiva con un epítipo diferente o el mismo antígeno o uno diferente), minicuerpos, heteroconjugados, diacuerpos, triacuerpos, quiméricos y anticuerpos sintéticos, así como fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a un antígeno con una propiedad de unión deseada y/o actividad biológica.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo, o población de anticuerpos similares, obtenido a partir de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden fabricar mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez en Kohler y Milstein (1975), *Nature*, vol 256: 495-497, o mediante procedimientos de ADN recombinante.

La expresión anticuerpo "quimérico" (o inmunoglobulina) se refiere a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera que es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos en particular, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada [Cabilly y *col.* (1984), a continuación; Morrison y *col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851].

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), así como anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones conservadoras de aminoácidos o restos no naturales de la misma especie o de una diferente que no alteran significativamente su unión y/o la actividad biológica. Dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región que determina la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen con restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, camello, bovino, cabra o conejo que tenga las propiedades deseadas. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o en las secuencias de la región marco. Estas modificaciones se efectúan para perfeccionar y optimizar adicionalmente el funcionamiento de los anticuerpos. Por lo tanto, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá

5 todos o al menos uno, y, en un aspecto dos, dominios variables en los que todas o todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc) o de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Cabilly y *col.*, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Cabilly y *col.*, Patente europea N° 0.125.023 B1; Boss y *col.*, Patente de Estados Unidos N° 4.816.397; Boss y *col.*, Patente europea N° 0.120.694 B1; Neuberger, M. S. y *col.*, documento de patente WO 86/01533; Neuberger, M. S. y *col.*, Patente europea N° 0.194.276 B1; Winter, Patente de Estados Unidos N° 5.225.539; Winter, Patente europea N° 0.239.400 B1; Padlan, E. A. y *col.*, Solicitud de Patente europea N° 0.519.596 A1; Queen y *col.* (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol 86: 10029-10033).

10 La expresión "anticuerpo biespecífico" puede hacer referencia a un anticuerpo, o un anticuerpo monoclonal, que tiene propiedades de unión para al menos dos epítomos diferentes. En una realización, los epítomos proceden del mismo antígeno. En otra realización, los epítomos proceden de dos antígenos diferentes. En la técnica se conocen procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden producir de forma recombinante usando la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina.
15 Como alternativa, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos biespecíficos.

La expresión "anticuerpo heteroconjugado" puede hacer referencia a dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se pueden preparar usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo el uso de agentes de reticulación. Tal como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a moléculas formadas por la unión covalente de uno o más fragmentos de anticuerpos o restos de unión a una o más moléculas de polímero.
20

La expresión "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epítomo deseado y, de algún modo, de 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 funciones efectoras y la modulación de otras interacciones con ligandos.
25

La expresión "ADN recombinante" se refiere a ácidos nucleicos y productos genéticos expresados a partir de los mismos que se han sometido a ingeniería, creado o modificado por el hombre. Los polipéptidos o proteínas "recombinantes" son polipéptidos o proteínas producidos por técnicas de ADN recombinante, por ejemplo a partir de células transformadas por un constructo de ADN exógeno que codifica el polipéptido o proteína deseado. Los polipéptidos o proteínas "sintéticos" son los que se preparan mediante síntesis química.
30

La expresión "casete de expresión" se refiere a una molécula de nucleótido capaz de afectar a la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia de codificación de proteína, tal como un anticuerpo de la invención) en un huésped compatible con dichas secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos un promotor unido de forma operativa a la secuencia que codifica el polipéptido y, opcionalmente, a otras secuencias, por ejemplo señales de terminación de la transcripción. Además, se pueden usar elementos reguladores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, por ejemplo potenciadores. Por lo tanto, los casetes de expresión incluyen plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector de "ADN desnudo" recombinante y similares.
35

Las fuentes de anticuerpos no se limitan a las usadas a modo de ejemplo en el presente documento (por ejemplo, anticuerpo de murino y de murino humanizado). Los anticuerpos pueden tener su origen en muchas especies que incluyen especies de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, camello, bovino, cabra, caballo, cobaya, hámster, oveja y conejo) y aves (pato, pollo). Los anticuerpos originados pueden provenir de una especie diferente del animal en el que se han originado. Por ejemplo, el Xenomouse™ (Abgenix, Inc., Fremont CA) produce anticuerpos monoclonales totalmente humanos. Para determinados fines, se pueden usar anticuerpos humanos nativos, tales como autoanticuerpos para S1P aislados a partir de individuos que pueden presentar un título de dicho anticuerpo de S1P.
40
45 Como alternativa, se puede usar una biblioteca de secuencias de anticuerpos humanos para generar anticuerpos que comprenden una secuencia humana.

2. Aplicaciones.

La invención se refiere a composiciones y procedimientos para tratar o prevenir determinadas enfermedades y afecciones, usando uno o más agentes terapéuticos que alteran la actividad o la concentración de uno o más lípidos bioactivos no deseados o precursores o metabolitos de los mismos. Los procedimientos terapéuticos y composiciones de la invención actúan cambiando la concentración eficaz, es decir la concentración y/o las actividades absolutas, relativas, eficaces y/o disponibles de determinados lípidos bioactivos no deseados. Se puede decir que la disminución de la concentración eficaz del lípido bioactivo "neutraliza" el lípido diana o sus efectos no deseados, incluidos los efectos corriente abajo. En el presente documento, "indeseado" se refiere a un lípido bioactivo que no se desea debido a su implicación en un proceso patológico, por ejemplo una molécula de señalización, o a una cantidad no deseada de un lípido bioactivo que contribuye a la enfermedad cuando está presente en exceso.
50
55

Sin desear quedar ligado a teoría alguna en particular, se cree que las concentraciones inadecuadas de S1P y/o sus metabolitos o efectores corriente abajo pueden causar o contribuir al desarrollo de diversas enfermedades y

trastornos. Como tales, las composiciones y procedimientos se pueden usar para tratar las enfermedades y trastornos, en particular disminuyendo la concentración eficaz *in vivo* de un lípido diana en particular, por ejemplo S1P o sus variantes. En particular, se cree que las composiciones y procedimientos de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades caracterizadas, al menos en parte, por neovascularización anómala, fibrogénesis, fibrosis, cicatrización, inflamación, y respuesta inmunitaria.

A continuación describen ejemplos de varias clases de enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con la invención. Se observada que muchas enfermedades y afecciones se caracterizan, al menos en parte, por múltiples procesos patológicos (por ejemplo, neovascularización y cicatrización patológica) y que las clasificaciones que se proporcionan en el presente documento son por comodidad descriptiva y no limitan la invención.

10 S1P y trastornos hiperproliferativos

Un aspecto de la invención se refiere al uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en procedimientos para tratar un trastorno hiperproliferativo. Estos usos comprenden administrar a un mamífero (por ejemplo, un bovino, canino, equino, ovino, porcino o animal, particularmente un ser humano), que se sabe o se sospecha que padece un trastorno hiperproliferativo asociado con S1P, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un agente que interfiere con la actividad S1P, preferentemente en un vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable, tal como lo pueda requerir la aplicación prevista. Los trastornos hiperproliferativos asociados con S1P incluyen neoplasias, trastorno asociado con la proliferación de células endoteliales, y trastornos asociados con la fibrogénesis. Muy a menudo, la neoplasia será un cáncer. Los trastornos habituales asociados con la proliferación celular endotelial son trastornos dependientes de la angiogénesis, por ejemplo, cánceres causados por tumores sólidos, tumores hematológicos, y degeneración macular relacionada con la edad. Los trastornos asociados con la fibrogénesis incluyen aquéllos que implican remodelación cardíaca anómala, tal como insuficiencia cardíaca.

Se conocen muchos trastornos hiperproliferativos, en los que las células de diversos tejidos y órganos presentan patrones anómalos de crecimiento, proliferación, migración, señalización, senescencia y muerte. Aunque se ha desarrollado una serie de tratamientos para hacer frente a algunas de estas enfermedades, muchos todavía permanecen sin tratar en gran medida con las tecnologías existentes, mientras que en otros casos, aunque los tratamientos están disponibles, con frecuencia son menos que óptimos y rara vez son curativos.

El cáncer representa tal vez la clase más ampliamente reconocida de trastornos hiperproliferativos. Los cánceres son una clase devastadora de enfermedades, y en conjunto, tienen una tasa de mortalidad solo superada por las enfermedades cardiovasculares. Muchos tipos de cáncer no se conocen por completo a un nivel molecular. Como resultado, el cáncer es un foco importante de los programas de investigación y desarrollo, tanto para el gobierno como para las compañías farmacéuticas de Estados Unidos. El resultado ha sido un esfuerzo de de I+D sin precedentes y la producción de muchos agentes terapéuticos valiosos para ayudar en la lucha contra el cáncer

Desafortunadamente, la enorme cantidad de investigación sobre el cáncer no ha sido suficiente para superar los importantes daños causados por el cáncer. Todavía hay más de un millón de nuevos casos de cáncer diagnosticados cada año y más de quinientas mil muertes solamente en Estados Unidos. Esta es una demostración impresionante de que a pesar de un que se ha propuesto un gran esfuerzo para descubrir nuevos agentes terapéuticos para el cáncer, los agentes terapéuticos eficaces para luchar contra la enfermedad sigue siendo difíciles de conseguir.

En la actualidad, el cáncer se trata principalmente con una o una combinación de tres tipos de terapias, cirugía, radiación, y quimioterapia. La cirugía consiste en la retirada de la mayor parte del tejido enfermo. Aunque en ocasiones la cirugía es eficaz para eliminar tumores localizados en determinados sitios, por ejemplo, en la mama, colon y piel, no se puede usar en el tratamiento de tumores localizados en otras áreas, tales como la columna vertebral, ni en el tratamiento de afecciones neoplásicas diseminadas tales como la leucemia. La radioterapia consiste en la exposición del tejido vivo a la radiación ionizante causando la muerte o daños a las células expuestas. Los efectos secundarios de la radioterapia pueden ser agudos y temporales, mientras que otros pueden ser irreversibles. La quimioterapia implica la alteración de la replicación celular o del metabolismo celular.

Además, es una ofensa que los agentes terapéuticos actuales impliquen generalmente inconvenientes significativos para el paciente en la forma de toxicidad y efectos secundarios graves. Por lo tanto, muchos grupos han comenzado recientemente a buscar nuevos enfoques para la lucha contra la guerra frente al cáncer. Estas nuevas denominadas "terapias innovadoras" incluyen terapia genética y proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos monoclonales.

El primer anticuerpo monoclonal usado en la clínica para el tratamiento del cáncer fue Rituxan (rituximab), que fue lanzado en 1997, y ha demostrado la utilidad de los anticuerpos monoclonales bioespecíficos como agentes terapéuticos. Por lo tanto, no es sorprendente que desde entonces se hayan aprobado otros dieciséis anticuerpos monoclonales para su uso en clínica, incluyendo seis que se prescriben para el cáncer. El éxito de estos productos, así como la reducción del coste y el tiempo para desarrollar anticuerpos monoclonales en comparación con las moléculas pequeñas ha hecho que los agentes terapéuticos de anticuerpos monoclonales sean la segunda categoría más grande de los fármacos candidatos detrás de las moléculas pequeñas. Además, la exquisita especificidad de los anticuerpos en comparación con los agentes terapéuticos de molécula pequeña ha demostrado ser una gran ventaja tanto en términos de eficacia como de toxicidad. Solo para el cáncer, en la actualidad existen más de 270 proyectos de I + D de

anticuerpos en la industria con más de 50 empresas que participan en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos de anticuerpos del cáncer. En consecuencia, los anticuerpos monoclonales están a punto de convertirse en un jugador importante en el tratamiento del cáncer y se estima que capturan una parte creciente del mercado terapéutico del cáncer.

5 La identificación de mediadores extracelulares que promueven el crecimiento y la supervivencia tumoral es una etapa crítica en el descubrimiento de intervenciones terapéuticas que reducirán la morbilidad y mortalidad por cáncer. Tal como se describe a continuación, se considera que la esfingosina-1-fosfato (S1P), un componente clave de la cascada de señalización de los esfingolípidos, es un factor de crecimiento pleiotrópico, tumorigénico. La S1P promueve el crecimiento tumoral mediante la estimulación de la proliferación celular, supervivencia celular y metástasis. La S1P también promueve la angiogénesis tumoral mediante el apoyo a la migración y la supervivencia de las células endoteliales ya que forman nuevos vasos dentro de los tumores. Tomadas en conjunto, la S1P inicia una secuencia proliferativa, proangiogénica y antiapoptótica de sucesos que contribuyen a la progresión del cáncer. Por lo tanto, las terapias que modulan, y, en particular, reducen los niveles de S1P *in vivo* serán eficaces en el tratamiento del cáncer.

15 La investigación ha demostrado que la esfingosina quinasa (SPHK) es un oncogén validado recientemente que produce una molécula de señalización de esfingolípido extracelular, la esfingosina-1-fosfato (S1P) que promueve el crecimiento del tumor. El crecimiento del tumor se promueve tanto directa como indirectamente por las acciones del factor de crecimiento de S1P relacionadas con la proliferación celular tumoral y la metástasis, así como los efectos proangiogénicos de S1P. El solicitante ha producido un anticuerpo anti-S1P monoclonal bioespecífico (mAb anti-S1P) que se podría usar como una esponja molecular terapéutica para absorber S1P selectivamente, reduciendo de ese modo las concentraciones extracelulares de este factor de crecimiento tumoral, con la reducción prevista del volumen del tumor y el potencial metastásico, así como bloqueando simultáneamente la formación de nuevos vasos sanguíneos que, de otro modo, podrían alimentar al tumor en crecimiento. El éxito anticipado del concepto de absorción molecular representará un enfoque innovador para el tratamiento del cáncer. Tal como demostrarán los párrafos que siguen a continuación, el solicitante ha desarrollado un mAb frente a un factor de crecimiento tumoral importante, la esfingosina-1-fosfato (S1P). El solicitante cree que este anticuerpo puede ser eficaz para reducir la proliferación, potencial metastásico y angiogénesis asociados con muchos tipos de cáncer, y por lo tanto, el cáncer en general, así como la angiogénesis tumoral que acompaña a la enfermedad.

30 La forma neutra de la esfingomielinasa (nSMasa) es un componente clave temprano de la ruta de señalización de esfingolípidos (Chatterjee, *Adv. Lipid Res.* 26: 25-46, 1993; Liu, Obein, y Hannun, *Semin. Cell Dev. Biol.* 8: 311-322, 1997). La nSMasa es solamente una al menos cinco clases de SMasas que se han identificado, incluyendo la alcalina, la ácida, la dependiente de cinc ácida, la dependiente de magnesio neutra, y la independiente de magnesio neutral (Liu, Obein, y Hannun, *Semin. Cell Dev. Biol.* 8: 311-322, 1997). La clase de nSMasas se asocia normalmente con membranas de superficie (Das, Cook, y Spence, *Biochim Biophys Acta* 777: 339 - 342, 1984; Dobrowsky, *Cell Signal* 12: 81-90, 2000) y se puede activar mediante una diversidad de estímulos que causan apoptosis, tales como la citoquina proinflamatoria, factor alfa de necrosis tumoral (TNF α) (Segui, y *col.*, *J. Clin. Invest.* 108: 143-151, 2001), receptor de linfocitos T (Tonnetti, y *col.*, *J. Exp. Med* 189: 1581-1589, 1999), radiación ionizante (Haimovitz-Friedman, y *col.*, *J. Exp. Med* 180: 525-535, 1994) y los agentes antineoplásicos de antraciclina (Andrieu-Abadie, y *col.*, *FASEB J.* 13: 1501-1510, 1999). El factor alfa de necrosis tumoral (TNF α) es un activador bien conocido de la nSMasa (Adam, y *col.*, *J. Bio Chem* 271: 14617-14622, 1996; Dressler, Matias, y Kolesnick, *Science* 255: 1715-1718, 1992; Kim, y *col.*, *J. Biol. Chem.* 266:1: 484-489, 1991; Kronke, *Chem Phys Lipids* 102: 157-66, 1999; Yanaga y Watson, *FEBS Letters* 314: 297-300, 1992), producción de CER (Kronke, *Chem Phys Lipids* 102: 157-66, 1999) y apoptosis (Rath y Aggarwal, *J. Clin. Immuno.* 19: 350-364, 1999; Robaye, y *col.*, *Am J Pathol* 138: 447-453, 1991; Takeda y *col.*, *Int. Immunol.* 5: 691-694, 1993) en muchos tipos de células, incluyendo las líneas celulares de cáncer (Andrieu-Abadie, y *col.*, *FASEB J.* 13: 1501-1510, 1999; Hannun y Obein, *Trends in Biol. Sci.* 20: 72-76, 1995; Kolesnick, *trends Biochem Sci* 24: 224-5, 1999; Obeid, y *col.*, *Science* 259: 1769-1771, 1993), y se ha mostrado que la activación de la nSMasa es crítica para la apoptosis inducida por TNF α (Luberto, y *col.*, *J. Biol. Chem.* 277: 41128-41139, 2002; Segui, y *col.*, *J. Clin. Invest.* 108: 143-151, 2001). Como consecuencia, también se ha propuesto la nSMasa como una diana para el descubrimiento de fármacos (Wascholowski y Giannis, *Drug News Perspect.* 14: 581-90, 2001).

50 La molécula de señalización de esfingolípidos, SIP, se produce a partir de SPH a través de la acción de la esfingosina quinasa (SPHK). Se han identificado dos isoformas de la quinasa, SPHK1 y SPHK2 (Liu, *J Biol Chem* 275: 19513-20, 2000; Nava, y *col.*, *Exp Cell Res* 281: 115-127, 2002). Aunque CER y SPH se asocia normalmente con la apoptosis, por el contrario S1P es un mediador de la proliferación celular y de la activación de rutas de supervivencia (An, *Ann N Y Acad Sci* 905: 25-33, 2000; Maceyka, y *col.*, *BBA* 1585: 193-201, 2002; Zhang, y *col.*, *J. Cell Biol.* 114: 155-167, 1991). Recientemente se ha apreciado como un mediador extracelular que puede activar un conjunto de Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCR) que pertenecen a la familia de receptores S1P/LPA, conocidos anteriormente como receptores Edg (An, *Ann N Y Acad Sci* 905: 25-33, 2000; An, Goetzl, y Lee, *J. cell biochem* 30/31: 147-157, 1998; Lee, y *col.*, *Science* 279: 1552-1555, 1998; Okamoto, y *col.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 203-208, 1999); sin embargo, también se han sugerido acciones intracelulares de S1P (Van Brocklyn, y *col.*, *J. Cell Biol.* 142: 229-240, 1998). Además, se ha sugerido que el equilibrio entre los niveles de CER/SPH frente a S1P proporciona un mecanismo de reóstato que decide si una célula se envía en la ruta de la muerte o se protege de la apoptosis (Kwon, y *col.*, *J Biol Chem* 276: 10627-10633, 2001; Maceyka, y *col.*, *BBA* 1585: 193-201, 2002; Pyne, *Biochem J.* 349: 385-402, 2000). La enzima reguladora clave del mecanismo de reóstato es SPHK cuyo papel es convertir los esfingolípidos que estimulan la muerte (CER/SPH) en S1P que estimula el crecimiento.

Un estudio como punto de referencia que propuso primero SPHK como un oncogén fue publicado por un grupo de Adelaida demostrando que los fibroblastos NIH-3T3 transfectados de forma estable con la quinasa presentaban un aumento de la proliferación celular acompañado por un aumento de la producción de S1P (Vadas y Gamble, *Circ. Res.* 79: 1216-1217, 1996; Xia y *col.*, *Curr Biol* 10: 1527-1530, 2000). Además, los sobreexpresadores de SPHK escaparon de la inhibición por contacto, una propiedad presentada normalmente por las células transformadas. Esta observación es coherente con un informe reciente que muestra que S1P aumenta el potencial metastásico de líneas celulares de cáncer humano seleccionadas (Igarashi, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 845: 19-31, 1998; Takuwa, *Biochim Biophys Acta.* 1582: 112-120, 2002). Además, los transfectantes produjeron tumores cuando se inyectaron por vía subcutánea en ratones NOD/SCID. Estos resultados se confirmaron recientemente en un estudio que muestra que un inhibidor de molécula pequeña de SPHK administrado por vía intraperitoneal podría reducir el volumen del tumor en ratones SCID que reciben inyecciones subcutáneas de células de adenocarcinoma de mama JC (French, y *col.*, *Cancer Res* 63: 5962-5969, 2003). De forma significativa, el concepto de que SPHK podría ser un nuevo oncogén se consolidó por el hallazgo de que SPHK se sobreexpresaba en muchos tumores sólidos, tales como los de mama, colon, pulmón, ovario, estómago, útero, riñón, y recto (French y *col.* (2003), mencionado anteriormente). Además, se ha demostrado que varias líneas celulares derivadas de tumores humanos podrían ser impulsadas en la apoptosis cuando se tratan con los inhibidores de molécula pequeña SPHK, y que su eficacia se podría explicar por su capacidad para reducir los niveles de S1P. Tomados en conjunto, estos hallazgos demuestran un concepto importante de que S1P es un factor de crecimiento producido probablemente por las propias células tumorales y que la reducción de la concentración de S1P puede causar la apoptosis observada después de la retirada del factor de crecimiento.

20 S1P y angiogénesis tumoral

La angiogénesis es el proceso por el cual los nuevos vasos sanguíneos se forman a partir de la vasculatura existente. La angiogénesis juega un papel crítico en varios procesos fisiológicos y está implicada en la patogénesis de una diversidad de trastornos, que incluyen crecimiento tumoral, invasión y metástasis. Se considera que el proceso de la angiogénesis asociada con tumores sólidos y circulares (angiogénesis tumoral) es un componente crucial de la tumorigénesis y la progresión de la enfermedad, con los nuevos vasos sanguíneos proporcionando una ventaja de crecimiento a las células tumorales en comparación con las células no cancerosas. Por lo tanto, el control clínico de la angiogénesis es un componente crítico para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades dependientes de la angiogénesis. Los agentes terapéuticos antiangiogénicos son particularmente atractivos porque las células endoteliales vasculares (EC) no mutan tan fácilmente como lo hacen las células cancerosas; en consecuencia, es menos probable que las EC sean menos propensas que las células cancerosas a ganar resistencia a la terapia prolongada, lo que las convierte en buenas dianas potenciales para agentes terapéuticos.

Varios factores de crecimiento se han implicado en la angiogénesis cancerosa. Se encontró que el biónido esfingosina-1-fosfato (S1P) era un mediador de muchos procesos celulares importantes para el cáncer. S1P ejerce la mayoría de sus efectos como un ligando específico para una familia de receptores acoplados a la proteína G, denominado S1P₁₋₅. Estos receptores regulan la angiogénesis y la maduración vascular, movimiento celular, y tráfico de linfocitos. Por el contrario a S1P, los precursores de S1P, esfingosina y ceramida, se han asociado con la detención del crecimiento y la apoptosis. Por último, existe un complejo de comunicación entre S1P y otros factores de crecimiento pro-angiogénicos tales como VEGF, EGF, PDGF, bFGF e IL-8. S1P, mediante la unión al receptor S1P₁, transactiva la tirosina quinasa de receptor del factor de crecimiento, tal como la que se encuentra en VEGFR, EGFR, y PDGFR. La importancia de S1P en los tumores que dependen de la angiogénesis hace que S1P sea un objetivo excepcional para el tratamiento del cáncer. En base a estas observaciones, un enfoque de anticuerpo para neutralizar el S1P extracelular podría dar lugar a una marcada disminución en la progresión del cáncer en los seres humanos como resultado de la inhibición de la formación de vasos sanguíneos con la pérdida simultánea de los nutrientes y el oxígeno necesario para apoyar el crecimiento del tumor. Además, investigaciones recientes sugieren que muchos inhibidores de la angiogénesis también pueden actuar como compuestos anti-invasivos y anti-metastásicos que también podría ayudar en la mitigación de la propagación del cáncer a sitios distantes del tumor inicial.

Un cuerpo creciente de evidencia reciente que implica a S1P como uno de los agentes proangiogénicos más potentes proviene de estudios que comparan directamente S1P con agentes tales como VEGF y bFGF. La S1P estimula la síntesis del ADN y la motilidad quimiotáctica de las células endoteliales venosas humanas (HUVEC), a la vez que induce la diferenciación de estructuras pluricelulares, todo lo cual sugiere la función de S1P en la formación de vasos sanguíneos iniciales (Argraves, y *col.*, 2004; Lee y *col.*, 1999; Liu, y *col.*, 2000). Además, S1P promueve la migración de precursores de las CE procedentes de la médula ósea a sitios de neovascularización (Annabi, y *col.*, 2003). Las células que sobreexpresan S1P₁ son resistentes a los agentes antiangiogénicos talidomida y Neovastat (Annabi y *col.*, 2003). Además, se ha demostrado que existe una comunicación sustancial entre S1P y otros factores de crecimiento proangiogénicos tales como VEGF, EGF, PDGF, bFGF e IL-8. Por ejemplo, S1P transactiva EGF (Shida, y *col.*, 2004) y receptores de VEGF2 (Spiegel y Milstien, 2003), y VEGF regula de forma positiva la expresión del receptor S1P₁ (Igarashi, y *col.*, 2003). Además, S1P, actuando a través de S1P₁ y el "eje de VEGF", se necesita para la angiogénesis y la neovascularización de las extremidades posteriores.

El enfoque antiangiogénico hacia el cáncer se ha avanzado en gran medida por la reciente aprobación de la FDA del fármaco antiangiogénico, bevacizumab (Avastin®, Genentech) para tratar el cáncer de colon como un complemento a la quimioterapia citotóxica.

Un MAb de murino anti-S1P, LT1002 se desarrolló recientemente con alta afinidad de unión y especificidad hacia S1P. Se demostró que LT1002 ralentizaba de forma significativa la progresión del tumor y la angiogénesis asociada en varios modelos animales de cáncer humano. Además, LT1002 atenuaba la formación de lesión por neovascularización corioidea (CNV) en el modelo bien establecido de angiogénesis para la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). CNV se produce en enfermedades en las que hay anomalías de la membrana de Bruch y el epitelio pigmentario de la retina. La enfermedad más común de este tipo es la AMD, la causa más frecuente de pérdida grave de visión en pacientes de edad avanzada. Estos resultados sugerían que LT1002 tiene varios mecanismos de acción, que incluyen: (1) efectos directos en el crecimiento de células tumorales, (2) un efecto antiangiogénico indirecto en células endoteliales vasculares, y (3) un efecto antiangiogénico indirecto de prevención de la liberación y acción de otros factores de crecimiento proangiogénicos.

La evidencia más directa *in vivo* de que S1P contribuye a la angiogénesis tumoral proviene de nuestra publicación reciente que se centró en un anticuerpo monoclonal murino (mAb) diseñado para neutralizar S1P extracelular por absorción molecular (Visentin, *y col.*, 2006). En diversos ensayos *in vitro* que usan las HUVEC, el mAb anti-S1P neutralizaba la formación de tubos, la migración de células endoteliales vasculares y la protección frente a la muerte celular, cada una de las cuales es inducida por S1P. S1P aumentó el nuevo crecimiento capilar en tapones de Matrigel implantados en ratones, un efecto que se neutralizó mediante la administración sistémica del mAb anti-S1P. El mAb neutralizó básicamente la angiogénesis inducida por bFGF y VEGF en un ensayo de tapón de Matrigel de murino, y el S1P mitigado por anticuerpos estimuló la liberación de citoquinas proangiogénicas (VEGF, IL-8, IL-6) a partir de células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Es importante destacar que los ratones xenoinjertados con células cancerosas humanas colocadas ortotópicamente presentaban un retraso sustancial de la progresión tumoral con el tratamiento con mAb anti-S1P. Esto se demostró en modelos murinos de cáncer humano de mama, de ovario y de pulmón y en un modelo de aloinjerto de melanoma murino (Visentin, *y col.*, 2006).

El uso de anticuerpos monoclonales (mAb) como un tratamiento terapéutico para una diversidad de enfermedades y trastornos está aumentando rápidamente debido a que han demostrado que son agentes terapéuticos seguros y eficaces. Los MAb terapéuticos aprobados incluyen Avastin®, Erbitux®, y Rituxan®. Los MAb adicionales están en diversas fases de desarrollo clínico para una diversidad de enfermedades con la mayoría dirigiéndose a diversas formas de cáncer. En general, los anticuerpos monoclonales se generan en mamíferos no humanos. La utilidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales murinos es limitada, sin embargo, debido principalmente al hecho de que los pacientes humanos montan su propia respuesta de anticuerpos a los anticuerpos murinos. Esta respuesta, la denominada respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón humano), da como resultado la neutralización eventual y la eliminación rápida de los mAb murinos. Esta limitación se ha superado con el desarrollo de un proceso llamado "humanización" de anticuerpos murinos. La humanización disminuye en gran medida el desarrollo de una respuesta inmune frente al MAb terapéutico administrado y por lo tanto evita la reducción de la vida media y la eficacia terapéutica posterior en HAMA. En su mayor parte, el proceso de humanización consiste en injertar las regiones que determinan la complementariedad de murino (CDR) en la región marco conservada (FR) de una inmunoglobulina humana. Esta estrategia se conoce como "injerto de CDR". La "retromutación" a restos de aminoácidos de murino de restos seleccionados en la FR humana a menudo se necesita para recuperar la afinidad que se pierde en el constructo injertado inicial.

La fabricación de los mAb es un proceso complejo que se deriva de la variabilidad de la propia proteína. La variabilidad de los mAb se puede localizar en la cadena principal de la proteína y/o en el resto de hidratos de carbono. La heterogeneidad se puede atribuir a la formación de emparejamientos disulfuro alternativos, desamidación y la formación de restos de isoaspartilo, metionina y oxidación de cisteína, ciclación de restos de glutamina N-terminales para piroglutamato y escisión enzimática parcial de lisinas C-terminales mediante carboxipeptidasas de mamíferos. Normalmente se aplica ingeniería a moléculas de anticuerpo para mejorar sus propiedades, tales como mayor estabilidad, resistencia a proteasas, comportamiento de agregación y aumento del nivel de expresión en sistemas heterólogos.

En el presente documento, se describe la humanización del MAb murino frente a la S1P. La estrategia general consistió en la implantación de las seis CDR a partir de LT1002 en una región marco humana. Se diseñaron otras modificaciones para perfeccionar y optimizar el rendimiento del anticuerpo. El MAb humanizado presentaba las mismas características que el LT1002 y por lo tanto es adecuado para someterlo a ensayo en ensayos clínicos.

S1P y fibrosis

Los fibroblastos, en particular los miofibroblastos, son elementos celulares fundamentales en la formación de cicatrices como respuesta a la lesión y a la inflamación celular [Tomasek, *y col.* (2002), *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol 3: 349-63, y Virag y Murry (2003), *Am J Pathol*, vol 163: 2433-40]. La expresión genética de colágeno por miofibroblastos es una evidencia de remodelación y es necesaria para la formación de cicatrices [Sun y Weber (2000), *Cardiovasc Res*, vol 46: 250-6, y Sun y Weber (1996), *J Mol Cell Cardiol*, vol 28: 851-8]. S1P estimula la curación de heridas mediante la activación de la migración y la proliferación de fibroblastos cada vez que aumenta la producción de colágeno [Sun, *y col.* (1994), *J Biol Chem*, vol 269: 16512-7]. La S1P producida localmente por células dañadas podría ser responsable de la curación de heridas inadaptada asociada con la remodelación y la formación de cicatrices. Por lo tanto, se cree que los inhibidores de S1P son útiles en enfermedades o afecciones caracterizadas, al menos en parte, por fibrogénesis o fibrosis anómalas. En el presente documento, "fibrogénesis" se define como una actividad excesiva o

índice de fibroblastos, y "fibrosis" se define como una actividad excesiva o índice de fibroblastos que conduce a una producción de colágeno y formación de cicatrices excesivas o inapropiadas, destrucción de la estructura del tejido fisiológico y/o contracción inapropiada de la matriz que conduce a dichas patologías tales como desprendimiento de retina u otros procesos que conducen a la alteración de la función de los órganos.

- 5 S1P y expresión de colágeno de fibroblastos: S1P estimula la diferenciación de fibroblastos inactivos para activar los miofibroblastos que presentan mayor expresión de colágeno durante la formación de cicatrices [Urata, *y col.* (2005), Kobe J Med Sci, vol 51: 17-27]. De forma simultánea a la proliferación y migración de fibroblastos en la zona de cicatrización, los miofibroblastos depositan una red granular temporal que consiste principalmente en osteopontina y fibronectina [Sun y Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6]. A medida que avanza la remodelación, la matriz temporal se absorbe y se establece una red de colágeno [Sun y Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6]. Los inventores han demostrado que la S1P promueve la producción de colágeno por miofibroblastos. Se ha mostrado que el TGF β , un mediador fibrótico bien conocido regula de forma positiva varias proteínas pro-fibróticas, convierte los fibroblastos en miofibroblastos y estimula la expresión de proteínas inflamatorias o posiblemente a través de la acción de S1P [Squires, *y col.* (2005), J Mol Cell Cardiol, vol 39: 699-707 y Butt Laurent y Bishop (1995), Eur J Cell Biol, vol 68: 330-5]. La regulación positiva de TIMP1, una molécula de señalización implicada en la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos estimulada por TGF β , se bloquea mediante el ARNsi frente a SPHK1 [Yamanaka, *y col.*, J Biol Chem. 24 de diciembre de 2004; 279 (52): 53994-4001], lo que sugiere que una versión humanizada del anticuerpo anti-S1P podría atenuar los efectos profibróticos del TGF β así como atenuar los efectos fibrogénicos de S1P en sí misma.
- 20 Se cree que la minimización de la cicatrización inadaptada es útil en el tratamiento de enfermedades y afecciones fibróticas, que incluyen, pero no se limitan a enfermedades oculares y cardiovasculares, curación de heridas, y esclerodermia.

Anticuerpos anti-S1P para el tratamiento de la esclerodermia

- 25 Las composiciones y procedimientos de la invención serán útiles para tratar trastornos y enfermedades caracterizadas, al menos en parte, por neovascularización, angiogénesis, fibrogénesis, fibrosis, cicatrización, inflamación, y respuesta inmune anómalas. Una de dichas enfermedades es la esclerodermia, que también se denomina esclerosis sistémica.

- 30 La esclerodermia es una enfermedad autoinmune que causa cicatrización o engrosamiento de la piel, y en ocasiones implica otras áreas del organismo, que incluyen los pulmones, corazón, y/o riñones. La esclerodermia se caracteriza por la formación de tejido cicatricial (fibrosis) en la piel y los órganos del organismo, que puede conducir al engrosamiento y dureza de las áreas implicadas, con una reducción posterior del funcionamiento. En la actualidad, aproximadamente 300.000 americanos tienen esclerodermia, de acuerdo con la Scleroderma Foundation. Un tercio o menos de los afectados tienen la enfermedad extendida, mientras que los dos tercios restantes presentan principalmente síntomas cutáneos. Cuando la enfermedad afecta a los pulmones y produce cicatrización, la respiración se puede ver restringida porque los pulmones ya no se pueden propagar como deberían. Para medir la capacidad respiratoria, los médicos usan un dispositivo que evalúa la capacidad vital forzada (FVC). En personas con una FVC inferior al 50 por ciento de la lectura esperada, la tasa de mortalidad a 10 años por enfermedad pulmonar relacionada con esclerodermia es de aproximadamente un 42 por ciento. Un motivo por el cual la tasa de mortalidad es tan elevada es que en la actualidad no se dispone de un tratamiento eficaz.

- 40 Tal como se describe en los ejemplos de la presente solicitud, las pruebas existentes indican que la S1P es un factores de crecimiento profibrótico que pueden contribuir a la activación de fibroblastos, proliferación y el aumento de la actividad de los fibroblastos resultante asociado con la cicatrización y remodelación inadaptada. Además, se han demostrado los posibles papeles para S1P en la actividad de la piel y otros tipos de fibroblastos. Por ejemplo, se ha mostrado que los lípidos bioactivos estimulan la migración de fibroblastos cutáneos de murino (Hama, *y col.*, J Biol Chem. 23 de abril de 2004; 279 (17): 17634-9), y los fibroblastos cutáneos expresan varios subtipos de receptores de S1P (Zhang, *y col.*, Blood. 1 de mayo de 1999; 93 (9): 2984-90). Además de los muchos efectos directos de S1P en la actividad de los fibroblastos, la S1P también puede tener muchos posibles efectos indirectos en la actividad de los fibroblastos. Por ejemplo, la S1P puede facilitar la acción de otros factores profibróticos bien conocidos, tales como el TGF- β y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). El TGF- β es uno de los contribuyentes a la fibrosis más ampliamente estudiados y reconocidos (Desmouliere, *y col.*, J Cell Biol 122: 103-111, 1993). El TGF- β regula de forma positiva la expresión de SphK1 y la actividad que conduce a un aumento de la expresión de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas 1 (TIMP-1), una proteína que inhibe la degradación de la ECM (Yamanaka, *y col.*, J Biol Chem 279: 53994-54001, 2004). El aumento de la expresión de TIMP-1 está unido a fibrosis intersticial y disfunción diastólica en pacientes con insuficiencia cardíaca (Heymans, *y col.*, Am J Pathol 166: 15-25, 2005). Por el contrario, la S1P estimula la expresión y la liberación de TGF- β (Norata, *y col.*, Circulation 111: 2805-2811, 2005). También existen distintas pruebas de comunicación entre S1P y PDGF. La S1P estimula directamente la expresión de PDGF (Usui, *y col.*, J Biol Chem 279: 12300-12311, 2004). Además, el receptor de S1P₁ y el receptor de PDGF se unen uno a otro y su asociación es necesaria para la activación de PDGF de la señalización corriente abajo que contribuye a la proliferación y migración de varios tipos celulares (Long, *y col.*, Prostaglandins Other Lipid Mediat 80: 74-80, 2006; Baudhuin *y col.*, Faseb J 18: 341-343, 2004). Como tal, los efectos de TGF- β y PDGF en la fibrosis se pueden deber, en parte, a la comunicación con la ruta de señalización de S1P. Como tales, las

composiciones y procedimientos de la invención se pueden usar para tratar la esclerodermia, en particular disminuyendo la concentración eficaz *in vivo* de un lípido diana en particular, por ejemplo S1P.

Se piensa que la esclerodermia sistémica empeora por los autoanticuerpos estimuladores frente a receptores del PDGF (Baroni, y *col.*, N Engl J Med. 2006 v354 (25): 2667-76), y los receptores del PDGF están regulados de forma positiva en fibroblastos de esclerodermia como respuesta a TGF- β (Yamakage, y *col.*, J Exp Med. 1 de mayo de 1992 1; 175 (5): 1227-34). Dada la comunicación sustancial entre los sistemas de señalización de S1P, PDGF y TGF- β , el bloqueo de la bioactividad de la S1P con un agente anti-S1P (por ejemplo, un mAb anti-S1P) podría atenuar indirectamente los efectos proescleróticos de PDGF y TGF- β . Además, el tratamiento con dicho agente anti-S1P podría beneficiar a los pacientes con esclerodermia atenuando los efectos directos de la S1P en la piel y otras formas de fibroblastos que contribuyen a la progresión de la enfermedad.

S1P y enfermedades y afecciones oculares

La angiogénesis/neovascularización patológica o anómala, remodelación anómala, fibrosis y cicatrización e inflamación se producen en asociación con enfermedades de la retina y oculares tales como degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatía diabética (DR), y en retinopatía del prematuro (ROP) y otros trastornos del desarrollo [Eichler, y *col.* (2006), Curr Pharm Des, vol 12: 2645-60], a la vez que son un resultado de infecciones y lesión mecánica del ojo [Ciulla, y *col.* (2001), Curr Opin Ophthalmol, vol 12: 442-9 y Dart y *col.* (2003), Eye, vol 17: 886-92]. Se cree que los anticuerpos frente a la S1P serán útiles para tratar enfermedades oculares para las que la angiogénesis/neovascularización patológica o anómala, remodelación anómala, fibrosis y cicatrización e inflamación son un componente.

Angiogénesis/Neovascularización del ojo:

La angiogénesis ocular patológica es una causa principal de ceguera en diversas afecciones clínicas. La neovascularización coroidea (CNV) se produce en varias enfermedades oculares, siendo la más prevalente de ellas la forma exudativa o "húmeda" de la AMD. Como resultado de una población cada vez más envejecida, la DME es una epidemia de hoy en día y es la causa principal de ceguera en el mundo occidental en pacientes mayores de 60 años de edad. A pesar de la epidemia de pérdida de visión causada por la AMD, solo unas pocas terapias, principalmente basadas en anti-VEGF, pueden ralentizar la progresión de la AMD e incluso menos pueden invertir la pérdida de visión [Bylsma y Guymer (2005), Clin Exp Optom, vol 88: 322-34, Gryziewicz (2005), Adv Drug Deliv Rev, vol 57: 2092-8, y Liu y Regillo (2004), Curr Opin Ophthalmol, vol 15: 221-6.]. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevos tratamientos para la neovascularización patológica es extremadamente importante.

La AMD se usa únicamente con fines ilustrativos en la descripción de afecciones oculares relacionadas con angiogénesis/neovascularización anómala, remodelación anómala, fibrosis y cicatrización, e inflamación, cuyas afecciones se encuentran en otras enfermedades y trastornos oculares tal como se divulga y reivindica en el presente documento. La AMD implica cambios patológicos relacionados con la edad [Tezel, Bora, y Kaplan (2004), Trends Mol Med, vol 10: 417-20 y Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, 122: 598-614]. Existen múltiples teorías pero la etiología y patogénesis exactas de la AMD todavía no se comprenden bien. El envejecimiento se asocia con lesiones oxidativas acumuladas, engrosamiento de la membrana de Bruch y formación de drusas. La tensión oxidativa da como resultado lesiones en las células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE) y, en algunos casos, en la lámina coriocapilar [Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614, y Gorin, y *col.* (1999), Mol Vis, vol 5: 29]. Probablemente, las lesiones en las RPE provocan una respuesta inflamatoria crónica dentro de la membrana de Bruch y en la coroides [Johnson y *col.* (2000), Exp Eye Res, vol 70: 441-9]. Esta lesión e inflamación fomenta y potencia los daños en la retina al estimular la CNV y atrofia [Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614, y Witmer, y *col.* (2003), Prog Retin Eye Res, vol 22: 1-29]. La CNV da como resultado vasos sanguíneos (BV) defectuosos y con fugas que probablemente se van a reconocer como heridas [Kent y Sheridan (2003), Mol Vis, vol 9: 747-55]. La curación de las heridas comienza en la coroides e invade el espacio subretiniano a través de la membrana de Bruch y el RPE. Las respuestas de curación de heridas se caracterizan por una respuesta de inflamación precoz habitual, una respuesta angiogénica importante y formación de tejido, seguido de la maduración en estadio terminal de todos los elementos implicados. La remodelación de heridas puede comprometer de forma irreversible a los fotorreceptores y los RPE, justificando de este modo la necesidad de tratar la CNV con algo más que terapias antiangiogénicas [La Cour, Kiilgaard, y Nissen (2002), Drugs Aging, vol 19: 101-33.12].

Las alteraciones en la arquitectura retiniana y subretiniana normal como resultado de fibrosis relacionada con CNV, edema e inflamación individualmente o de forma acumulativa, conducen a una pérdida de visión relacionada con la AMD [Tezel y Kaplan (2004), Trends Mol Med, vol 10: 417-20, y Ambati, y *col.* (2003), Surv Ophthalmol, vol 48: 257-93]. Las múltiples interacciones celulares y de las citoquinas que se asocia con la AMD exudativa complican considerablemente la búsqueda de tratamientos eficaces. Aunque la CNV y el edema se pueden tratar en parte con agentes terapéuticos anti-VEGF, no se han abordado adecuadamente los posibles tratamientos para atenuar la formación de cicatrices y la inflamación [Bylsma y Guymer (2005), Clin Exp Optom, vol 88: 322-34, y Pauleikhoff (2005), Retina, vol 25: 1065-84]. Siempre que el complejo neovascular permanezca intacto, como parece ser el caso en pacientes tratados con agentes anti-VEGF, el potencial de fibrosis subretiniana y futura pérdida de visión persiste.

Las terapias anti-VEGF-A representan un avance reciente, significativo en el tratamiento de la AMD exudativa. Sin

embargo, en el Ensayo de VISION en fase III con PEGAPTANIB, un aptámero de alta afinidad que inhibe de forma selectiva la isoforma 165 de VEGF-A, demostró que el paciente medio sigue perdiendo visión y solo un pequeño porcentaje ganó visión [Gragoudas, y col. (2004), N Engl J Med, vol 351: 2805-16]. La inhibición de todas las isoformas de VEGF-A (inhibición de pan-VEGF) con el fragmento de anticuerpo RANIBIZUMAB dio resultados mucho más impresionantes [Brown, y col., N Eng Med (2006), vol. 355:1432-44, Rosenfeld, y col. N Eng J Med (2006), vol. 355: 1419-31]. En el ensayo de 2 años de duración MARINA y el ensayo ANCHOR de 1 año de duración demostraron que aproximadamente un 40 % de los pacientes alcanza alguna ganancia visual. Aunque estos resultados representan un gran importante en nuestra capacidad para tratar la AMD exudativa, también demuestran que un 60 % de los pacientes no presentan mejora visual. Además, estos pacientes tenían que cumplir unos criterios de inclusión y de exclusión estrictamente definidos. Los resultados en una población más amplia de pacientes pueden ser menos sólidos.

Todavía existe una necesidad bien definida de desarrollar agentes terapéuticos adicionales que se dirigen a otras etapas en el desarrollo de la CNV y los procedimientos que conducen en última instancia a la destrucción de fotorreceptores. En primer lugar, el crecimiento de BV coroides implica una interacción dispuesta entre muchos mediadores, no solo el VEGF, lo que ofrece la oportunidad de modular o inhibir la totalidad del procedimiento [Gragoudas, y col. (2004), N Engl J Med, vol 351: 2805-16]. En segundo lugar, la AMD exudativa comprende componentes vasculares y extravasculares. El componente vascular implica células endoteliales vasculares (EC), precursores de EC y pericitos. El componente extravascular, que aparece volumétricamente como el componente mayor, está compuesto por células epiteliales inflamatorias, gliales y pigmentarias de la retina (RPE) y fibroblastos. Los daños tisulares pueden ser resultado de cualquiera de estos componentes. Los actuales tratamientos anti-VEGF no abordan estos otros aspectos del proceso patológico. La dirección de elementos adicionales de la cascada angiogénica asociada con la AMD podría proporcionar un enfoque más eficaz y sinérgico a la terapia [Spaide, RF (2006), Am J Oftalmol, vol 141: 149-156].

Inflamación en la enfermedad ocular:

Cada vez existen más evidencias de que la inflamación, específicamente los macrófagos y el sistema del complemento [Klein, y col. (2005), Science, vol 308: 385-9; y Hageman, y col.(2005), Proc Natl Acad Sci USA, vol 102: 7227-32], desempeñan un papel importante en la patogénesis de la AMD exudativa. La histopatología de las membranas neovasculares coroides extirpadas quirúrgicamente demuestra que los macrófagos están presentes de forma casi universal [Grossniklaus, y col. (1994), Ophthalmology, vol 101: 1099-111, y Grossniklaus, y col. (2002), Mol Vis, vol 8: 119-26]. Existen abundantes evidencias de que los macrófagos pueden desempeñar un papel activo en la mediación de la formación de CNV y su propagación [Grossniklaus, y col. (2003), Mol Vis, vol 8: 119-26; Espinosa-Heidmann, y col. (2003), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 44: 3586-92; Oh, y col. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1891-8; Cousins, y col. (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 1013-8; Forrester (2003), Nat Med, vol 9: 1350-1, y Tsutsumi, y col. (2003), J Leukoc Biol, vol 74: 25-32] mediante múltiples efectos que incluyen la secreción de enzimas que pueden dañar a las células y degradar la membrana de Bruch así como la liberación de citoquinas proangiogénicas [Otani, y col. (1999), Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1912-20, y Amin, Puklin, y Frank (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 35: 3178-88]. En el lugar de la lesión, los macrófagos presentan signos micromorfológicos de activación, tal como desgranulación [Oh, y col. (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 40: 1891-8, y Trautmann y col. (2000), J Pathol, vol 190: 100-6]. Por lo tanto, se cree que una molécula que limite la infiltración de macrófagos en el complejo neovascular coroides puede ayudar a limitar la formación de la CNV.

Neovascularización Coroidea y maduración de vasos sanguíneos en la enfermedad ocular:

La angiogénesis es un componente esencial de la curación de heridas normal, ya que administra oxígeno y nutrientes a las células inflamatorias y ayuda a eliminar residuos [Lingen (2001), Arch Pathol Lab Med, vol 125: 67-71]. La angiogénesis progresiva está formada por dos procesos distintos: Etapa I: Migración de las EC vasculares, como respuesta a estímulos cercanos, a los extremos de los capilares en los que proliferan y se forman estructuras luminarias; y Etapa II: Corrección de la red vascular y optimización de la vasculatura [Guo, y col. (2003), Am J Pathol, vol 162: 1083-93].

Etapa I: Neovascularización. La angiogénesis suele ayudar a la curación de heridas. Sin embargo, los vasos nuevos, cuando no están controlados, son defectuosos normalmente y fomentan pérdidas, hemorragias e inflamación. La reducción de los BV disfuncionales y permeables mediante la dirección a los GF proangiogénicos ha demostrado alguna capacidad para ralentizar la progresión de la AMD [Pauleikhoff (2005), Retina, vol 25: 1065-84,14, y van Wijngaarden, Coster, y Williams (2005), JAMA, vol 293: 1509-13].

Etapa II: Maduración de los vasos sanguíneos y desensibilización a fármacos. La inhibición de Pan-VEGF parece que ejerce su efecto beneficioso en su mayor parte a través de una acción de antipermeabilización que da como resultado la resolución del edema intra y subretiniano, ya que la lesión real de la CNV no involucre considerablemente. La ausencia de una involución marcada de la CNV puede ser el resultado, en parte, de la maduración de los vasos recién formados debido al revestimiento con pericitos. Los pericitos desempeñan un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento del tejido vascular. La presencia de pericitos parece conferir resistencia a los agentes anti-VEGF y compromete su capacidad para inhibir la angiogénesis [Bergers y Song (2005), Neuro-oncol, vol. 7 452-64; Yamagishi e Imaizumi (2005), Int J Tissue React, vol 27: 125-35; Armulik, Abramsson y Betsholtz (2005), Circ Res, vol 97: 512-23; Ishibashi y col. (1995), Arch Ophthalmol, vol 113: 227-31]. Un agente que tiene un efecto inhibitor sobre el reclutamiento

de pericitos alteraría con probabilidad el ensamblaje de los canales vasculares y la maduración de los canales neovasculares coroideos perpetuando de ese modo su sensibilidad a los agentes antiangiogénicos.

La remodelación de la red vascular implica ajustes en la densidad de los vasos sanguíneos (BV) para satisfacer las necesidades nutricionales [Gariano y Gardner (2005), *Nature*, 438: 960-6]. Los periodos de inmadurez de los BV corresponden a los periodos en los que los vasos nuevos están funcionando pero todavía no han adquirido un revestimiento de pericitos [Benjamin, Hemo, y Keshet (1998), *Development*, 125: 1591-8, y Gerhardt y Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res*, 2003, 314: 15-23]. Este retraso es esencial para proporcionar una ventana de plasticidad para el ajuste fino del desarrollo de la vasculatura de acuerdo con las necesidades nutricionales de la retina o la coroides.

El lípido bioactivo esfingosina-1-fosfato (S1P), VEGF, PDGF, las angiopoyetinas (Ang) y otros factores de crecimiento (GF) aumentan el crecimiento de los vasos sanguíneos y reclutan células de músculo liso (SMC) y pericitos para los vasos sin tratamiento previo que estimulan la remodelación de los vasos emergentes [Allende y Proia (2002), *Biochim Biophys Acta*, vol 582: 222-7; Gariano y Gardner (2005), *Nature*, vol 438: 960-6; Grosskreutz y col., (1999), *Microvasc Res*, vol 58: 128-36; Nishishita, y Lin (2004), *J Cell Biochem*, vol 91: 584-93 y Erber y col., (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40.32]. Los pericitos, muy probablemente generados por diferenciación *in situ* de precursores mesenquimatosos en el momento del brote de las CE o por la migración y diferenciación de las células de músculo liso arterial, se asocian íntimamente y envuelven las CE dando como resultado la madurez vascular global y la supervivencia [Benjamin, Hemo y Keshet (1998), *Development*, vol 125: 1591-8]. En estudios recientes se ha demostrado que la S1P y el receptor S1P1 están implicados en el tráfico en la superficie celular y la activación de la molécula de adhesión célula-célula N-cadherina [Paik, y col. (2004), *Genes Dev*, vol 18: 2392-403]. La N-cadherina es esencial para las interacciones entre CE, pericitos y células murales que estimulan el desarrollo de un lecho vascular estable [Gerhardt and Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res*, vol 314: 15-23]. La supresión global del gen de S1P1 da como resultado la envoltura de las células murales anómalas de los BV nacientes necesarios para la estabilización de los BV durante el desarrollo embrionario [Allende y Proia (2002), *Biochim Biophys Acta*, vol 1582: 222-7]. La inyección local del ARNsi en S1P1 suprime la estabilización vascular en modelos de xenoinjerto tumoral [Chae, y col. (2004), *J Clin Invest*, vol 114: 1082-9]. En estudios con ratones transgénicos se ha demostrado que VEGF y PDGF-B estimulan la maduración y la estabilización de nuevos BV [Guo, y col. (2003), *Am J Pathol*, 162: 1083-93, y Gariano y Gardner 2005), *Nature*, vol 438: 960-6.50]. El VEGF regula de forma positiva la Ang-1 (ARNm y proteína) [Asahara, y col. (1998), *Circ Res*, vol 83: 233-40]. La Ang-1 desempeña un papel principal en el reclutamiento y sostén del soporte periendothelial por los pericitos [Asahara, y col. (1998), *Circ Res*, vol 83: 233-40]. La inyección intraocular de VEGF aceleró la cobertura por pericitos del plexo de EC [Benjamin, Hemo, y Keshet (1998), *Development*, vol 125: 1591-8]. Los embriones de ratón deficientes en PDGF-B carecen de pericitos microvasculares, lo que conduce a edema, microaneurismas y hemorragias letales [Lindahl, y col. (1997), *Science*, vol 277: 242-5]. En estudios prenatales murinos se ha demostrado que se requieren señales adicionales para completar la estimulación por VEGF y PDGF de la maduración del lecho vascular. En base a la transactivación de la S1P indicada anteriormente, este factor podría ser la S1P [Erber y col. (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40]. La estabilización y maduración de los vasos se asocia con una pérdida de plasticidad y la ausencia de regresión a la retirada de VEGF y otros GF y resistencia a terapias antiangiogénicas [Erber, y col. (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40, y Hughes y Chan-Ling (2004), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 45: 2795-806]. Los pericitos confieren resistencia de los BV a los inhibidores angiogénicos que estabilizan inicialmente los vasos maduros y los que se reclutan para vasos inmaduros después de la terapia [Erber, y col. (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40]. Después de envolver las EC inmaduras, los pericitos expresan factores de supervivencia compensatorios (Ang-1 y PDGF-B) que protegen las EC de los agentes proapoptóticos.

Edema y permeabilidad vascular en enfermedad ocular:

Las membranas de la CNV están formadas por EC vasculares fenestradas que tienden a perder sus contenidos intravasculares en el espacio circundante dando como resultado hemorragia subretiniana, exudados y acumulación de fluidos [Gerhardt y Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res*, vol 14: 15-23]. Durante muchos años se ha implicado al tejido de la propia CNV, y más recientemente a la neovascularización intrarretiniana, como responsables de la disminución de la agudeza visual asociada con la AMD. No obstante, en la actualidad se piensa que el edema macular causado por un aumento de la permeabilidad vascular (VP) y la posterior rotura de la barrera hematorretiniana (BRB) desempeñan un papel importante en la pérdida de visión asociada con la AMD y otras enfermedades oculares, incluyendo ceguera asociada con diabetes. [Hughes y Chan-Ling (2004), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 45: 2795-806; Felinski y Antonetti (2005), *Curr Eye Res*, vol 30: 949-57; Joussem, y col. (2003), *FASEB J*, vol 17: 76-8, y Strom, y col. (2005), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 46: 3855-8]. En particular, la retinopatía diabética (DR) y el edema macular diabético (DME) son complicaciones microvasculares comunes en pacientes con diabetes y son las causas más comunes de ceguera asociada con diabetes. El DME resulta del aumento de la permeabilidad microvascular. Joussem, y col. (2003), *FASEB J*, vol 17: 76-8. En conjunto estas son las causas más comunes de nueva ceguera en la población en edad laboral. Se cree que compuestos, tales como anticuerpos que se dirigen a S1P, serán terapéuticamente útiles para estas afecciones.

A continuación, se describen ejemplos de varias clases de enfermedades oculares que se pueden tratar de acuerdo con la invención. Se observará que muchas enfermedades y afecciones se caracterizan, al menos en parte, por múltiples procesos patológicos (por ejemplo, tanto neovascularización patológica como cicatrización) y que las clasificaciones que se proporcionan en el presente documento son por comodidad descriptiva y no limitan la invención.

a. Retinopatías isquémicas asociadas con neovascularización patológica y enfermedades caracterizadas por formación de membrana epirretiniana y/o subretiniana.

Las retinopatías isquémicas (IR) son un grupo diverso de trastornos caracterizados por un flujo sanguíneo retiniano comprometido. Ejemplos de IR incluyen retinopatía diabética (DR), retinopatía del prematuro (ROP), retinopatía de células falciformes y enfermedad oclusiva venosa retiniana. Todos estos trastornos se pueden asociar con una proliferación dirigida por VEGF de neovascularización retiniana patológica que, en última instancia, puede conducir a hemorragias intraoculares, formación de membrana epirretiniana y desprendimiento de retina por tracción. Las membranas epirretinianas idiopáticas (ERM), también denominadas arruga macular o retinopatía en celofán, pueden producir de una reducción de la visión secundaria a la distorsión de la arquitectura de la retina. En ocasiones estas membranas recurren a pesar de la eliminación quirúrgica y en ocasiones se asocian con isquemia retiniana. VEGF y sus receptores se localizan en las ERM. La presencia de VEGF en las membranas asociadas con retinopatía diabética proliferativa, vitreoretinopatía proliferativa y arruga macular sugiere adicionalmente que esta citoquina desempeña un papel importante en la angiogénesis en la enfermedad retiniana isquémica y en el crecimiento de la membrana en trastornos vitreoretinianos proliferativos. Además, los receptores de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 también se identifican en las células en las ERM. Estos datos muestran que el VEGF puede ser un estimulador autocrino y/o paracrino que puede contribuir a la progresión de las ERM vasculares y avasculares. PDGF y sus receptores [Robbins, y col. (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 35: 3649-3663] se ha descrito en ojos con enfermedades retinianas proliferativas [Cassidy, y col. (1998), Br J Ophthalmol; vol 82: 181-85, y Freyberger, y col. (2000), Exp Clin Endocrinol Diabetes, vol 108: 106-109]. Estos hallazgos sugieren que los ligandos de PDGF y sus receptores están extendidos en las membranas retinianas proliferativas de origen diferente y sugieren que la estimulación autocrina y paracrina con PDGF puede estar implicada en la patogénesis de las ERM. El factor β de crecimiento transformante (TGF- β) está implicado en la formación de ERM [Pournaras, y col. (1998), Klin Monatsbl Augenheilkd, vol 212: 356-358] tal como se demuestra mediante la tinción y la inmunorreactividad de TGF. Además, el receptor II de TGF- β se expresa en miofibroblastos de ERM de membranas diabéticas y de PVR. Estos resultados sugieren que el TGF- β producido en múltiples tipos celulares en la retina y en las ERM es una diana atractiva para el tratamiento de la PVR, ERM diabética y secundaria. Se ha informado que la interleuquina 6 (IL-6) está aumentada en el cuerpo vítreo humano en la retinopatía diabética proliferativa (PDR) [La Heij, y col. (2002), Am J Ophthalmol, 134: 367-375] y en un estudio, un 100 % de las ERM diabéticas estudiadas expresaban la proteína IL-6 [Yamamoto, y col. (2001) Am J Ophthalmol, vol 132: 369-377].

Se ha mostrado que la administración exógena del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) induce la proliferación endotelial y expresión de VEGF [Stavri, y col. (1995), Circulation, vol 92: 11-14]. Coherente con estas observaciones, la concentración de bFGF está aumentada en muestras de cuerpo vítreo de pacientes con PDR [Sivalingam, y col. (1990), Arch Ophthalmol, vol 108: 869-872, and Boulton, y col. (1997), Br J Ophthalmol, vol 81: 228-233]. El bFGF también está implicado en la formación de las ERM [Hueber, y col. (1996), Int. Ophthalmol, vol 20: 345-350] mostrando a bFGF en 8 de 10 membranas de PDR estudiadas. Además, estos investigadores encontraron tinción positiva para el receptor correspondiente, FGFR1. También se ha demostrado inmunorreactividad para bFGF en las ERM idiopáticas no vasculares. Estos resultados implican a bFGF en la formación de las ERM tanto vasculares como avasculares [Harada, y col. (2006), Prog in Retinal and Eye Res, vol 25: 149-164]. Además, se ha detectado bFGF elevado en el suero de pacientes con ROP [Becerril, y col. (2005), Ophthalmology, vol 112, 2238].

Dados los efectos pleotrópicos conocidos de S1P y sus interacciones con VEGF, bFGF, PDGF, TGF- β y IL-6, se cree que un agente que se une, antagoniza, inhibe los efectos o la producción de S1P será eficaz en la supresión de la neovascularización retiniana patológica en retinopatías isquémicas y enfermedades del segmento posterior caracterizadas por formación de ERM vascular o avascular. Otras afecciones oculares caracterizadas, al menos en parte, por neovascularización anómala o angiogénesis, incluyen degeneración macular relacionada con la edad, rechazo al injerto de córnea, glaucoma neovascular, desgarro del cristalino por contacto, infecciones de la córnea, incluyendo herpes simple, herpes zóster e infecciones protozoicas, pterigión, uveítis infecciosa, desprendimiento de retina crónico, lesión por láser, retinopatía por Células falciformes, enfermedad oclusiva venosa, neovascularización coroidea, proliferación angiomasosa retiniana y vasculopatía coroidea polipoidal idiopática.

b. Vitreoretinopatía proliferativa (VRP).

La PVR se observa tras el desprendimiento retiniano regmatógeno espontáneo y tras el desprendimiento traumático de la retina. Es una causa principal de cirugía fallida por desprendimiento retiniano. Se caracteriza por el crecimiento y la contracción de las membranas celulares en ambos lados de la retina, en la superficie vítrea posterior y en la base vítrea. Este desarrollo de tejido cicatricial excesivo en el ojo puede conducir al desarrollo de desprendimiento de retina por tracción y, por lo tanto, los tratamientos dirigidos a la prevención o la inhibición de la vitreoretinopatía proliferativa (PVR) son un principio lógico del tratamiento del desprendimiento de retina. Histológicamente, la PVR se caracteriza por un exceso en la producción de colágeno, contracción y proliferación celular [Michels, Retinal Detachment 2ª Edición. Wilkinsin CP, Rice TA Eds, Complicated types of retinal detachment, páginas 641-771, Mosby St Louis 1997]. Los tipos de células identificados en las membranas de PVR incluyen principalmente células epiteliales pigmentarias retinianas, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales vasculares [Jerdan, y col. (1989), Ophthalmology, vol 96: 801-10, y Vidinova, y col. (2005), Klin Monatsbl Augenheilkd; vol 222:568-571]. La fisiopatología de esta reacción de cicatrización excesiva parece estar mediada por una serie de citoquinas que incluyen factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor beta de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), interleuquina 6 (IL-6), e interleuquina 8 (IL-8) [Naginani, y col. (2005), J Cell Physiol, vol 203: 35-43; La Heij, y

col (2002), *Am J Ophthalmol*, 134: 367-75; Planck, *y col.* (1992), *Curr Eye Res*; vol 11: 1031-9; Canataroglu *y col.* (2005) *Ocul Immunol Inflamm*; vol 13: 375-81, y Andrews, *y col.* (1999), *Ophthalmol Vis Sci*; vol 40: 2683-9]. La inhibición de estas citoquinas puede ayudar a prevenir el desarrollo de PVR si se administra en el momento adecuado o se limita su gravedad [Akiyama, *y col* (2006), *J Cell Physiol*, vol 207:407-12, y Zheng, *y col* (2003), *Jpn J Ophthalmol*, vol 47:158-65].

5 La esfingosina-1-fosfato (S1P) es un lípidio bioactivo con efectos pleotrópicos. Es proangiogénico, proinflamatorio (estimula el reclutamiento de macrófagos y mastocitos) y profibrótico (estimula la formación de cicatrices). La S1P generalmente estimula la proliferación y migración de células y es antiapoptótica. La S1P consigue estas funciones biológicamente diversas a través de sus interacciones con numerosas citoquinas y factores de crecimiento. Se ha demostrado que la inhibición de S1P a través de un anticuerpo monoclonal (SPHINGOMAB) bloquea las funciones del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), bFGF, IL-6 e IL-8 [Visentin, B *y col.* (2006), *Cancer Cell*, vol 9: 1-14]. La unión de S1P al receptor de S1P₁ también puede aumentar la producción de PDGF; por lo tanto, también se podría esperar que se une a S1P disminuya la producción de PDGF [Milstien y Spiegel (2006), *Cancer Cell*, vol 9:148-150]. Tal como se muestra en los Ejemplos que siguen a continuación, en la actualidad se ha demostrado que la S1P, *in vitro*, transforma las células del RPE humano en un fenotipo similar al de los miofibroblastos parecido al tipo observado en la PVR. Dada la fisiopatología que, en última instancia, da como resultado la cicatrización excesiva observada en la PVR y los efectos conocidos de la S1P en estos mismos mediadores clave, se cree que un agente que se une, antagoniza o inhibe los efectos de la producción de S1P será eficaz para eliminar o minimizar el desarrollo de PVR y sus efectos que dañan gravemente el ojo.

c. Uveítis.

20 La uveítis es un trastorno inflamatorio del tracto uveal del ojo. Puede afectar a la parte frontal (anterior) o trasera (posterior) del ojo o a ambas. Puede ser de etiología idiopática o infecciosa y puede amenazar a la visión. La uveítis idiopática se ha asociado con un aumento de la expresión de CD4⁺ en la cámara anterior [Calder, *y col.* (1999), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 40: 2019-24]. Los datos también sugieren un papel patológico de los linfocitos T y su IP-10 quimioattractor en la patogénesis de la uveítis [Abu E1-Asrar (2004), *Am J Ophthalmol*, vol 138: 401-11]. Otras quimioquinas en la uveítis anterior aguda incluyen proteínas inflamatorias de macrófagos, proteína 1 quimioattractora de monocitos e IL-8. Probablemente estas citoquinas desempeñen un papel crítico en el reclutamiento de leucocitos en la uveítis anterior aguda. Verma, *y col.* (1997), *Curr Eye Res*; vol 16; 1202-8. Dados los efectos profundos y pleiotrópicos de la cascada de señalización de la S1P, se cree que SPHINGOMAB y otros restos inmunitarios que reducen la concentración eficaz de los lípidos bioactivos serviría como procedimiento eficaz para reducir o modular la inflamación intraocular asociada con la uveítis.

d. Cirugía refractiva.

La respuesta a la curación de heridas en la córnea es de particular importancia para los procedimientos quirúrgicos refractivos, ya que es un determinante principal de la seguridad y la eficacia. Estos procedimientos se realizan para el tratamiento de miopía, hiperopía y el astigmatismo. La queratomileusis *in situ* asistida por láser (LASIK) y la queratectomía fotorrefractiva (PRK) son los procedimientos refractivos más habituales, aunque se han desarrollado otros en un intento de superar las complicaciones. Estas complicaciones incluyen sobrecorrección, subcorrección, regresión y opacificación estromal, entre otras. Una serie de complicaciones frecuentes están relacionadas con la respuesta de cicatrización y tienen sus raíces en la respuesta biológica a la cirugía. Uno de los mayores desafíos en la biología de la córnea es estimular la reparación tisular a través de la regeneración en lugar de la fibrosis. Se cree que la elección entre la regeneración y la fibrosis reside en el control de la activación de los fibroblastos [Stramer, *y col* (2003), *Invest Ophthalmol Vis Sci*; vol 44: 4237-4246, y Fini (1999) *Prog Retin Eye Res*, vol 18: 529-551]. Las células denominadas miofibroblastos pueden aparecer en el estroma subepitelial 1-2 semanas después de la cirugía o la lesión. Los miofibroblastos se derivan probablemente de los queratocitos bajo la influencia de TGF- β [Jester, *y col.* (2003), *Exp Eye Res*, vol 77: 581-592]. La neblina corneana y la cicatrización estromal se caracterizan por reducción de la transparencia corneana y se pueden asociar con la generación de fibroblastos y miofibroblastos. En estudios *in situ* e *in vitro* se ha sugerido que TGF- β y PDGF son importantes en la estimulación de la diferenciación de los miofibroblastos [Folger, *y col.* (2001), *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42: 2534-2541]. La neblina se puede observar en la superficie de contacto central después de LASIK en determinadas circunstancias. Estas incluyen queratitis lamelar difusa, colgajos con forma de donut y retención de residuos epiteliales en la superficie de contacto. Es probable que cada uno de éstos se asocie con un aumento del acceso de TGF- β de las células epiteliales a los queratocitos activados [Netto, *y col.* (2005), *Cornea*, vol 24: 509-522]. La regresión se debe, muy probablemente, a las interacciones de curación de heridas epiteliales-estromales potenciadas, tales como el aumento de la producción de factores de crecimiento de modulación del epitelio por los fibroblastos y/o los miofibroblastos de la córnea [Netto, *y col.* (2005), mencionado anteriormente]. Se ha mostrado que la inhibición de la unión de TGF- β a los receptores con el anticuerpo anti-TGF- β tópico reduce la neblina inducida por PRK [Jester, *y col.* (1997), *Cornea*, vol 16: 177-187]. Dados los efectos conocidos de los anticuerpos lipídicos anti-bioactivos en el proceso fibrótico y TGF- β , los inventores creen que puede ayudar a tratar algunas de las complicaciones de la cirugía refractiva, tales como neblina, cicatrización estromal y regresión.

e. Modulación de la Cirugía de Filtración del Glaucoma.

60 Clásicamente se cree que el glaucoma es una enfermedad en la que la elevada presión intraocular produce daños en

el nervio óptico y, en última instancia, compromete el campo visual y/o la agudeza visual. Existen otras formas de glaucoma en las que se pueden producir daños en el nervio óptico dentro de una situación de presión normal o el denominado "glaucoma de tensión normal". Para muchos pacientes, los medicamentos pueden controlar su enfermedad, pero para otros se necesita cirugía de filtración para el glaucoma, en la que se crea quirúrgicamente una fístula en el ojo para permitir el drenaje del fluido. Esto se puede conseguir mediante trabeculectomía, la implantación de un dispositivo médico u otros procedimientos de intervención quirúrgica. La cirugía de filtración para el glaucoma falla debido a un proceso de curación de heridas que se caracteriza por la proliferación de fibroblastos y, en última instancia, cicatrización. Los anti-metabolitos, tales como el 5-fluorouracilo y la mitomicina C, pueden reducir la cicatrización posterior; sin embargo, incluso con el uso de estos fármacos, el seguimiento a largo plazo muestra que el fallo de la cirugía sigue siendo un problema clínico serio [Mutsch y Grehn (2000), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol; vol 238: 884-91, y Fontana, y col. (2006), Ophthalmology, vol 113: 930-936]. Los estudios de fibroblastos de la cápsula de Tenon humana demuestran que estos tienen la capacidad de sintetizar bFGF y PDGF y TGF- β y que estos factores de crecimiento están implicados en el proceso de reparación tisular después de la cirugía de filtración del glaucoma que contribuye al fallo del procedimiento. Trpathi, y col. (1996), Exp Eye Res, vol 63: 339-46, En estudios adicionales también se ha implicado a estos factores de crecimiento en la respuesta de las heridas después de la filtración [Denk, y col. (2003), Curr Eye Res; vol 27: 35-44] y concluyeron que diferentes isoformas de PDGF son estimulantes principales de la proliferación de los fibroblastos de la cápsula de Tenon después de la cirugía de filtración del glaucoma, mientras que el TGF β es esencial para la transformación de los fibroblastos de la cápsula de Tenon en miofibroblastos. Los inventores han demostrado que S1P está presente en los fibroblastos de la cápsula de Tenon/conjuntiva y que S1P se expresa fuertemente en la respuesta de curación de heridas. La S1P también estimula la función profibrótica de múltiples tipos de células de fibroblastos y la transformación en el fenotipo de miofibroblasto y la producción de colágeno. Dados los efectos pleotrópicos específicos de la S1P y sus interacciones conocidas con bFGF, PDGF y TGF-beta, se cree que un agente que se une, antagoniza, inhibe los efectos o la producción de S1P será eficaz en la modulación de la curación de heridas y/o la respuesta fibrótica que conduce a fallos en la cirugía de glaucoma y será un procedimiento terapéutico eficaz para potenciar los resultados quirúrgicos con éxito. Se ha previsto que el agente se pueda administrar, por Ejemplo, mediante inyección intravítrea o subconjuntival o por vía tópica.

f. Transplante de córnea.

El transplante de córnea (queratoplastia penetrante (PK)) es el procedimiento de transplante de tejido con mayor éxito en seres humanos. A pesar de los 47.000 trasplantes de córnea que se realizan anualmente en Estados Unidos, el rechazo del aloinjerto de córnea sigue siendo la principal causa de fallo del injerto de córnea [Ing, y col. (1998), Ophthalmology, vol 105: 1855-1865]. En la actualidad no tenemos suficiente capacidad para evitar el rechazo del aloinjerto, aunque la inmunosupresión y la inmunomodulación pueden ser un enfoque prometedor. Recientemente se ha descubierto que los linfocitos T CD4 (+) funcionan directamente como células efectoras y no como células auxiliares en el rechazo de los aloinjertos de córnea. Hegde, y col. (2005), Transplantation, vol 79: 23-31. En estudios murinos se ha demostrado un aumento del recuento de neutrófilos, macrófagos y mastocitos en el estroma de las córneas que sufren rechazo. Los macrófagos eran el tipo principal de célula infiltrante, seguida de los linfocitos T, los mastocitos y los neutrófilos. La expresión temprana de las quimioquinas en el transplante de córnea de alto riesgo fue el homólogo de la IL-8 en ratón (proteína 2 inflamatoria de macrófagos) y la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) [Yamagami, y col. (2005), Mol Vis, vol 11,632-40].

FTY720 (FTY) es un nuevo fármaco inmunosupresor que actúa alterando el tráfico de linfocitos; lo que da como resultado linfopenia en sangre periférica y aumento del recuento de linfocitos en los ganglios linfáticos. FTY media sus efectos moduladores del sistema inmunitario uniéndose a algunos de los receptores de S1P expresados en los linfocitos [Bohler, y col. (2005), Transplantation, vol 79: 492-5]. El fármaco se administra por vía oral y una sola dosis oral redujo los recuentos de linfocitos periféricos en un 30-70 %. FTY redujo la subpoblación de linfocitos T, células CD4(+) más que las células CD8(+). Bohler, y col. (2004), Nephrol Dial Transplant, vol 19: 702-13. Los ratones tratados con FTY mostraron un aumento significativo de la supervivencia del injerto de córnea ortotópico cuando se administrada por vía oral. Zhang, y col. (2003), Transplantation, vol 76: 1511-3. El tratamiento con FTY oral también retrasó de forma significativa el rechazo y disminuyó su gravedad en un modelo de rata a ratón de xenotransplante de córnea [Sedlakova, y col. (2005), Transplantation, vol 79, 297-303]. Dada la patogénesis conocida del rechazo del aloinjerto combinado con los datos que sugieren que la modulación de los efectos de la señalización de S1P puede mejorar la supervivencia del injerto de córnea, se cree que los restos inmunes que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos, por Ejemplo, SPHINGOMAB, también serán útiles en el tratamiento de afecciones inmunológicas tales como el rechazo del aloinjerto, por ejemplo atenuando la respuesta inmunitaria, y, por lo tanto, probablemente mejorará la supervivencia del injerto de córnea tras la PK. Además, el fármaco puede tener la ventaja añadida de que, además de la administración sistémica, es posible la administración local, por ejemplo por vía periocular tópica o intraocular.

Otras enfermedades oculares con un componente inflamatorio o inmune incluyen vitritis crónica, infecciones, incluyendo las infecciones por herpes simple, herpes zóster y protozoicas, y la histoplasmosis ocular.

g. Enfermedades del Segmento Anterior Caracterizadas por Cicatrización.

También se cree que el tratamiento con un anticuerpo dirigido a lípidos bioactivos beneficia varias afecciones

caracterizadas por cicatrización de la porción anterior del ojo. Estas incluyen las siguientes:

i. Traumatismo

La córnea, como la estructura más anterior del ojo, está expuesta a diversos riesgos que van desde residuos transmitidos por el aire a traumatismos contusos que pueden dar como resultado un traumatismo mecánico. La córnea y la superficie anterior del ojo también se pueden exponer a otras formas de traumatismo por cirugía y lesiones químicas, tales como por bases y ácidos. Los resultados de estos tipos de lesiones pueden ser devastadores, y a menudo conducen a formación de simbléfaron por cicatrización en la córnea y en la conjuntiva. Además, se puede producir neovascularización de la córnea. Se produce acumulación de neutrófilos, su liberación de leucotrienos y la presencia de interleuquina-1 y de interleuquina-6 sirven para reclutar las oleadas sucesivas de células inflamatorias [Sotozono, y col. (1997), *Curr Eye Res*, vol 19: 670-676] que infiltran la córnea y liberan enzimas proteolíticas que conducen a daños adicionales y rotura del tejido corneal y una fusión de la córnea. Además, los fibroblastos de la córnea y de la conjuntiva se activan e invaden y llevan a la formación de depósitos de colágeno y fibrosis. Los efectos indeseables de una inflamación excesiva y cicatrización se estimulan con TGF- β . Saika, y col. (2006), *Am J Pathol* vol 168, 1848-60. Este proceso conduce a una pérdida de transparencia de la córnea y alteración de la visión. La reducción de la inflamación, incluyendo la disminución de los infiltrados de neutrófilos y la reducción de la fibrosis dio como resultado una curación más rápida y más completa en un modelo murino de córneas quemadas con álcali [Ueno, y col. (2005), *Oftalmol Vis Sci*, vol 46: 4097-106].

ii. Penfigoide Cicatricial Ocular (OCP)

El OCP es una enfermedad autoinmune cicatrizante (de formación de cicatrices) crónica que afecta principalmente a la conjuntiva. La enfermedad es invariablemente progresiva y el pronóstico es bastante malo. En sus etapas finales, la cicatrización de la conjuntiva y la queratopatía asociada conducen a ceguera bilateral. Histológicamente, la conjuntiva muestra cicatrización de la submucosa e inflamación crónica en la que la participación de los mastocitos es sorprendentemente grande [Yao, y col. (2003), *Ocul Immunol Inflamm*, vol 11: 211-222]. Los autoantígenos conducen a la formación de autoanticuerpos. La unión del autoanticuerpo al autoantígeno ponen en marcha una serie compleja de sucesos con infiltración de linfocitos T en la que las células CD4 (auxiliares) superan en número a las células CD8 (supresoras). Además, se produce infiltración de macrófagos y mastocitos, así como la liberación de citoquinas proinflamatorias y profibróticas. Se produce proliferación y activación de fibroblastos en la conjuntiva inducidas por citoquinas, dando como resultado fibrosis subepitelial (véanse los ejemplos en lo sucesivo en el presente documento). En los estudios se ha demostrado un papel de TGF- β e IL-1 en la fibrosis conjuntiva en pacientes con OCP [Razzaque, y col. (2004), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 45: 1174-81].

iii. Síndrome de Stevens Johnson (SJS) y Necrólisis Epidérmica Tóxica (TEN)

SJS y TEN son reacciones adversas a medicamentos potencialmente mortales. Las secuelas oculares de estas dos afecciones relacionadas pueden ser graves e implican cambios patológicos de la conjuntiva bulbar y palpebral, párpados y córnea. Los fármacos y las infecciones son los factores más desencadenantes más comunes. Los hallazgos crónicos en el ojo incluyen cicatrización, formación de simbléfaron y cicatrización de la conjuntiva como resultado del proceso inflamatorio inicial. Esto conduce a formación de entropión, triquiasis e inestabilidad de la película lagrimal. La rotura de la superficie ocular conduce a cicatrización de la córnea, neovascularización y, en los casos graves, queratinización. Como en el OCP, se produce fibrosis subepitelial de la conjuntiva. Se cree que una respuesta autoinmunitaria enérgica de los linfocitos a un fármaco o infección desempeña un papel en el desarrollo de SJS/TEN. Harilaos, y col. (2005), *Erythema Multiforme, Stevens Johnson Syndrome, and Toxic Epidermal Necrolysis*, en *Cornea* 2ª edición. Krachmer, Mannis, Holland eds. Elsevier Mosby Philadelphia. La población de células infiltrantes en SJS incluye macrófagos, linfocitos T positivos para CD4 y linfocitos T positivos para CD8. Esta población celular es similar a las observadas en las lesiones químicas. Kawasaki, y col. (2000), *J Ophthalmol*, vol 84: 1191-3.

iv. Pterigión

Clínicamente un pterigión aparece como una masa vascular carnosa que se produce en la fisura interpalpebral. El cuerpo del pterigión es una masa fibrovascular carnosa. El pterigión activo se caracteriza por una marcada congestión vascular y crecimiento progresivo. Se adhiere firmemente al globo. En los casos avanzados, el pterigión llega a la córnea y puede producir pérdida de visión secundaria a pérdida de transparencia de la córnea dentro del eje visual o astigmatismo irregular. Sintomáticamente, los pacientes pueden experimentar sensación de cuerpo extraño, lagrimeo y visión borrosa. La histopatología demuestra hialinización del tejido conjuntivo subepitelial de la sustancia propia, aumento del número de fibroblastos y aumento de mastocitos. Butrus, y col. (1995), *Am J Ophthalmol*, vol 119: 236-237. El tratamiento del pterigión sigue siendo un problema. A menudo se realiza escisión quirúrgica, sin embargo las tasas de recurrencia son elevadas [Krag, y col. (1992), *Acta Ophthalmol*, vol 70: 530]. Con el fin de ayudar a disminuir la tasa de recurrencia del pterigión se han usado diversos adyuvantes farmacológicos tales como Mitomicina C y daunorrubicina. Aunque estos pueden ser útiles, los datos a largo plazo son limitados y se pueden asociar con adelgazamiento de la esclerótica y fusión de la córnea. Dougherty, y col. [(1996), *Cornea*, vol 15: 537-540, y Lee, y col. (2001), *Cornea*, vol 20: 238-42] fueron los primeros en demostrar que el VEGF puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del pterigión y en la identificación del VEGF y el óxido nítrico en el epitelio del pterigión. Estos investigadores postularon la hipótesis de que estas, así como otras citoquinas son responsables del crecimiento hacia dentro fibrovascular

característico del pterigión. Se ha demostrado la presencia de FGF y TGF-beta 1 básicos en el pterigión tanto primario como recurrente [Kira, y col. (1998), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, vol 236: 702-8] y las pruebas morfológicas e inmunohistoquímicas publicadas avalan adicionalmente la idea de que la angiogénesis puede desempeñar un papel en la formación del pterigión [Marcovich, y col (2002), Curr Eye Res, vol 25:17-22]. En otros estudios se ha implicado a IL-6 e IL-8, así como a VEGF, como mediadores que pueden ser relevantes para el desarrollo de pterigión [Di Girolamo, y col. (2006), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 47: 2430-7]. Un agente eficaz frente a la formación y crecimiento del pterigión puede disminuir la necesidad de intervención quirúrgica o reducir las tasas de recurrencia.

Otras enfermedades y afecciones oculares con un componente de fibrogénesis, fibrosis o cicatrización incluyen AMD, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, retinopatía de células falciformes, retinopatía isquémica, enfermedad oclusiva venosa retiniana y sobredesgaste por lentes de contacto.

En resumen, la cicatrización excesiva es un componente subyacente de la fisiopatología de muchas enfermedades y afecciones oculares y no oculares. Los lípidos bioactivos como S1P desempeñan un papel en este proceso y un tratamiento relacionado con anticuerpos para disminuir las concentraciones de estos agentes probablemente conducirá a un beneficio terapéutico para pacientes que están recibiendo el tratamiento. En una realización, se cree que los inhibidores de lípidos bioactivos, en particular anticuerpos monoclonales dirigidos frente a S1P y/o sus variantes son útiles en la modulación de las respuestas de curación de heridas quirúrgicas y traumáticas.

Fibrosis, fibrogénesis y formación de cicatrices:

La formación de fibrosis subretiniana conduce de daño irreversible a los fotorreceptores a pérdida de visión permanente. Siempre y cuando el complejo neovascular permanezca intacto, tal como parece que es el caso en pacientes tratados con agentes anti-VEGF, el potencial de fibrosis subretiniana y pérdida de visión del futuro persiste. En una actualización del estudio PRONTO de RANIBIZUMAB (Lucentis®), se descubrió que los pacientes con pérdida de visión lo hicieron como resultado de cualquiera de fibrosis subretiniana o un desgarro del RPE. Un agente que podría disminuir el grado de infiltración de fibroblastos y la deposición de colágeno sería valioso.

Los fibroblastos, los miofibroblastos en particular, son elementos celulares fundamentales en la formación de cicatrices en respuesta al daño celular y la inflamación [Tomasek, y col. (2002), Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-63, y Virag y Murry (2003), Am J Pathol, vol 163: 2433-40]. La expresión genética del colágeno por los miofibroblastos es una evidencia de la remodelación y es necesaria para la formación de cicatrices [Sun y Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6, y Sun and Weber (1996), J Mol Cell Cardiol, vol 28: 851-8]. S1P estimula la curación de heridas mediante la activación de la migración y la proliferación de fibroblastos a la vez que aumenta la producción de colágeno [Sun, y col. (1994), J Biol Chem, vol 269: 16512-7]. S1P producido localmente por las células dañadas podría ser responsable de la curación de heridas de mala adaptación asociado con la remodelación y la formación de cicatrices. Por lo tanto, se cree que los inhibidores de S1P son útiles en enfermedades o afecciones caracterizadas, por lo menos en parte, por fibrogénesis o fibrosis anómala.

La formación de fibrosis subretiniana conduce a un daño irreversible a los fotorreceptores y pérdida de visión permanente. Siempre y cuando el complejo neovascular permanezca intacto, tal como parece ser el caso en pacientes tratados con agentes anti-VEGF, el potencial de fibrosis subretiniana y futura pérdida de visión persiste.

La reducción al mínimo de la formación de cicatrices de mala adaptación por neutralización de S1P podría ser beneficioso y evitar pérdidas de agudeza visual irreversibles mediante la limitación de la extensión de la fibrosis subretiniana y daños posteriores a fotorreceptores. La creciente evidencia sugiere que la S1P podría contribuir tanto en las primeras como en las últimas etapas de la remodelación de la retina de mala adaptación asociadas con la AMD exudativa. S1P tiene un efecto proangiogénico no dependiente de VEGF pronunciado. Además, S1P estimula la migración, proliferación y supervivencia de múltiples tipos de células, incluyendo fibroblastos, EC, pericitos y células inflamatorias - las mismas células que participan en los múltiples procesos de mala adaptación de la AMD exudativa y otros trastornos oculares. S1P está unida a la producción y activación de VEGF, bFGF, PDGF, y otros factores de crecimiento (GF) implicados en la patogénesis de la AMD exudativa. Por último, S1P puede modular la maduración de la vasculatura sin tratamiento previo, un proceso que conduce a una pérdida de sensibilidad a los agentes antiangiogénicos. La inhibición de la acción de S1P podría ser un tratamiento terapéutico eficaz para la AMD exudativa que puede ofrecer ventajas significativas sobre los enfoques anti-VEGF exclusivamente o puede actuar de forma sinérgica con ellos para abordar los procesos complejos y múltiples etapas que en última instancia conducen a la pérdida visual asociada a la AMD.

En la actualidad, las modalidades terapéuticas favorecidas para AMD incluyen Lucentis® y el uso sin autorización de Avastin® (Genentech, Inc.), los cuales se dirigen a un solo factor de crecimiento (VEGF-A) y parece que ejerce la mayor parte de su efecto beneficioso a través de una acción de antipermeabilidad que da como resultado la solución del edema subretiniano e intraretiniano, ya que la lesión neovascular coroidea real (CNV) involucre notablemente. Sin embargo, la pérdida de visión relacionada con la AMD exudativa no se debe únicamente al edema subretiniano e intraretiniano inducido por CNV. La alteración y la remodelación patológica de la arquitectura retiniana y subretiniana causada colectivamente por CNV, fibrosis subretiniana, edema e inflamación en conjunto dan como resultado pérdida de la agudeza visual asociada con la AMD. Estas causas múltiples no se tratan con los tratamientos disponibles, incluyendo Lucentis™. Por lo tanto, un agente terapéutico que pudiera tratar los mecanismos múltiples que causan la

pérdida de visión sería de gran valor, como monoterapia o en combinación con otro agente, tal como un agente anti-VEGF (por ejemplo, Lucentis® o Avastin®).

5 Por lo tanto, sin desear quedar ligado por teoría alguna en particular, se cree que el nivel de esfingolípidos no deseables tales como S1P, y/o uno o más de sus metabolitos, causa no contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades y trastornos oculares en los que la inflamación, fibrosis y/o angiogénesis inapropiadas están implicadas en la patogénesis de la enfermedad. Las enfermedades y afecciones del ojo en las que con probabilidad los anticuerpos anti-S1P son clínicamente útiles incluyen retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, edema macular diabético, PVR, enfermedades del segmento anterior y edema macular relacionado con la edad, tanto húmedo como seco, y procedimientos posteriores tales como trabeculectomía o implantación de válvulas en el glaucoma.

10 Anticuerpos anti-S1P y anti-LPA para el tratamiento de la esclerodermia

Las composiciones y procedimientos de la invención serán útiles para tratar trastornos y enfermedades caracterizados, al menos en parte, por neovascularización anómala, fibrogénesis, fibrosis, cicatrización, inflamación y respuesta inmunitaria. Una de dichas enfermedades es la esclerodermia, que también se denomina esclerosis sistémica.

15 La esclerodermia es una enfermedad autoinmune que produce cicatrización o engrosamiento de la piel y en ocasiones afecta a otras áreas del cuerpo, que incluyen pulmones, corazón y/o riñones. La esclerodermia se caracteriza por la formación de tejido cicatricial (fibrosis) en la piel y los órganos del cuerpo, que puede conducir a engrosamiento y firmeza de las áreas implicadas, con la consiguiente reducción de la función. En la actualidad, aproximadamente 300.000 americanos padecen esclerodermia de acuerdo con la Scleroderma Foundation. Un tercio o menos de los afectados tienen la enfermedad extendida, mientras que los dos tercios restantes tienen principalmente síntomas cutáneos. Cuando la enfermedad afecta a los pulmones y produce cicatrización, la respiración puede llegar a restringirse porque los pulmones ya no pueden propagarse como deberían. Para medir la capacidad respiratoria, los médicos usan un dispositivo que evalúa la capacidad vital forzada (CVF). En personas con una FVC inferior a un 50 por ciento de la lectura esperada, la tasa de mortalidad a 10 años por enfermedad pulmonar relacionada con esclerodermia es de aproximadamente un 42 por ciento. Un motivo por el cual la tasa de mortalidad es tan elevada es que en la actualidad no se dispone de un tratamiento eficaz.

25 Sin desear quedar ligado por teoría alguna en particular, se cree que las concentraciones inapropiadas de lípidos tales como S1P y/o sus metabolitos, causa no contribuyen al desarrollo de la esclerodermia. Como tal, las composiciones y procedimientos de la invención se pueden usar para tratar la esclerodermia, en particular en mediante la disminución de la concentración eficaz *in vivo* de un lípido diana en particular, por ejemplo, S1P.

30 Tal como se describe en cualquier parte en la presente solicitud, la evidencia existente indica que S1P es un factor de crecimiento profibrótico que puede contribuir a la activación de fibroblastos, proliferación, y al aumento de la actividad de fibroblastos resultante asociado con la cicatrización de mala adaptación y remodelación. Se cree que la bioactividad de S1P y un agente anti-S1P (por ejemplo, un mAb anti-S1P) podría atenuar indirectamente los efectos proescleróticos de PDGF y TGF- β . Además, el tratamiento con dicho agente anti-S1P podría beneficiar a los pacientes con esclerodermia mediante la atenuación de los efectos directos de S1P en la piel y otras formas de fibroblastos que contribuyen a la progresión de la enfermedad.

Trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares

35 Sin desear quedar ligado por teoría alguna en particular, el nivel de esfingolípidos indeseables tales como CER, SPH, o S1P, y/o uno o más de sus metabolitos, puede ser responsable directamente de la disfunción cardíaca, durante o después de la isquemia cardíaca tal como durante la lesión por reperfusión y la remodelación cardíaca resultante e insuficiencia cardíaca.

40 Dado que los esfingolípidos tales como S1P están implicados en la fibrogénesis y curación de heridas del tejido hepático (Davaile, *y col.*, J. Biol. Chem. 275:34268-34633, 2000; Ikeda, *y col.*, Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279:G304-G310, 2000), la curación de vasculaturas heridas (Lee, *y col.*, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278:C612-C618, 2000), y otras patologías, o sucesos asociados con dichas enfermedades, tales como cáncer, angiogénesis e inflamación, (Pyne, *y col.*, Biochem. J. 349:385-402, 2000), se pueden aplicar las composiciones y procedimientos de la divulgación para tratar no solamente estas enfermedades sino también enfermedades cardíacas.

45 lo anterior sugiere que los esfingolípidos derivados de fuentes cardíacas u otras no cerebrales podrían contribuir a una apoplejía. En consecuencia, la interferencia con la producción y/o la acción de los esfingolípidos puede ser beneficiosa para atenuar la apoplejía, en particular la apoplejía causada por enfermedad vascular periférica, aterosclerosis y trastornos cardíacos. La evidencia reciente sugiere que la S1P administrada de forma exógena cruza la barrera hematoencefálica y estimula la vasoconstricción cerebral (Tosaka, *y col.*, Stroke 32: 2913-2919, 2001).

50 Se ha sugerido que un suceso temprano en el transcurso de la isquemia cardíaca (es decir, la falta de suministro de sangre al corazón) es un exceso de producción del compuesto esfingosina de origen natural por el músculo cardíaco, y que otros metabolitos, particularmente S1P también se producen ya sea por el propio tejido cardíaco o por componentes de la sangre como consecuencia de la producción de esfingolípidos cardíacos y una conversión

posterior en la sangre. La presente invención proporciona procedimientos para la neutralización de S1P con anticuerpos monoclonales humanizados específicos. Por lo tanto, la presente invención proporciona anticuerpos anti-esfingolípidos humanizados y composiciones y procedimientos relacionados para reducir los niveles en sangre y en tejidos del esfingolípido fundamental, S1P. Dichos anticuerpos son útiles, por ejemplo, para la unión y por lo tanto para la reducción de la concentración eficaz de esfingolípidos indeseables en la sangre completa.

Se dice que los procedimientos y composiciones terapéuticos de la invención "se basan en esfingolípidos" con el fin de indicar que estas terapias pueden cambiar la concentración o concentraciones relativas, absolutas o disponibles de determinados esfingolípidos tóxicos o cardiotoxicos indeseables. Un "esfingolípido tóxico" se refiere a cualquier esfingolípido que puede causar o potenciar la necrosis y/o apoptosis de las células o de otra manera alterar la función de un órgano o tejido (por ejemplo, a través de la fibrosis excesiva), incluyendo, en algunos casos, tipos de células en particular que se encuentran en tejidos u órganos específicos. "Esfingolípidos cardiotoxicos" son esfingolípidos tóxicos que estimulan directa o indirectamente la insuficiencia cardíaca a través de la cicatrización de mala adaptación (fibrogénesis) y provocan un estado inotrópico negativo o provocan o potencian la necrosis y/o apoptosis de las células que se encuentran o se asocian con el corazón, incluyendo pero no limitado a cardiomiocitos, neuronas cardíacas y similares, y/o puede causar la pérdida de la función cardíaca debido a los efectos de vasoconstricción/espasmo coronario arrítmicos inotrópicos negativos de los esfingolípidos y/o de sus metabolitos. Los "esfingolípidos indeseables" incluyen esfingolípidos tóxicos y cardiotoxicos, así como metabolitos, en particular precursores metabólicos de esfingolípidos tóxicos y cardiotoxicos. Los esfingolípidos indeseables, cardiotoxicos, y/o tóxicos de interés en particular incluyen, pero no se limitan a, ceramida (CER), ceramida-1-fosfato (C1P), esfingosina-1-fosfato (S-1-P), dihidro-S1P (DHS1P), esfingosifosforil colina (SPC), esfingosina (SPH; D (+) - eritro-2-amino-4-trans-octadeceno-1,3-diol, o esfinganina) y diversos metabolitos.

Se sabe que una de las primeras respuestas de los miocitos cardíacos a la hipoxia y reoxigenación es la activación de la esfingomielinasa neutra y la acumulación de ceramida. Hernandez, *y col.* (2000), *Circ. Res.* 86: 198-204, 2000. SPH se ha implicado presuntamente como mediador de un sucesos temprano de señalización en la muerte celular apoptótica en una diversidad de tipos celulares (Ohta, *y col.*, *FEBS Letters* 355: 267-270, 1994; Ohta, *y col.*, *Cancer Res.* 55: 691-697, 1995; Cuvillier, *y col.*, *Nature* 381: 800-803, 1996). Se postula que los efectos cardiotoxicos de la hipoxia pueden resultar en parte de la producción de esfingolípidos y/o de la producción inadecuada de otros metabolitos (por ejemplo, protones, calcio, y determinados radicales libres) o moléculas de señalización (por ejemplo, MAP quinasas, caspasas) que afectan negativamente a la función cardíaca.

S1P se almacena en las plaquetas y es un componente normal del plasma y del suero humano (Yatomi, *y col.*, *J. Biochem.* 121: 969-973, 1997). S1P es un vasoconstrictor coronario y tiene otros efectos biológicos en corazones caninos. Sugiyama, *y col.* (2000), *Cardiovascular Res.* 46: 119-125. Se ha postulado un papel para S1P en la aterosclerosis (Siess, *y col.*, *IUBMB Life* 49: 161-171, 2000). Esto ha sido apoyado por otros datos, incluyendo la evidencia de que el efecto protector de HDL se debe al bloqueo de la producción de S1P (Xia, *y col.*, *PNAS* 95: 14196-14201, 1998; Xia, *y col.*, *J Biol Chem* 274: 33143-33147, 1999).

Se ha informado que la esfingomielina, el precursor metabólico de la ceramida, aumentó en los animales de experimentación sometidos a hipoxia (Sergeev, *y col.*, *Kosm. Biol. Aviakosm. Med. (Rusia)* 15: 71-74, 1981). Otros estudios han informado de que las membranas internas de las células musculares contienen altas cantidades de SPH y esfingomielina (Sumnicht, *y col.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 215: 628-637, 1982; Sabbadini, *y col.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193752-758, 1993). El tratamiento de animales experimentales con toxinas fúngicas de fumonisina B da como resultado un aumento de los niveles en suero de SPH y DHS1P (S1P no se midió) con efectos inotrópicos negativos coincidentes en el corazón (Smithe, *y col.*, *Toxicological Sciences* 56: 240-249, 2000).

Otras enfermedades o afecciones

Debido a la participación de la señalización de lípidos bioactivos en muchos procesos, incluyendo neovascularización, angiogénesis, fibrogénesis anómala, fibrosis y cicatrización, e inflamación y respuestas inmunes, se cree que los inhibidores de estos lípidos bioactivos serán útiles en una diversidad de enfermedades y afecciones asociadas con uno o más de estos procesos. Dichas enfermedades y afecciones pueden ser sistémicas (por ejemplo, esclerodermia sistémica) o localizadas en uno o más sistemas específicos del organismo, partes u órganos (por ejemplo, piel, pulmón, sistema cardiovascular o el ojo).

Una forma de controlar la cantidad de esfingolípidos indeseables en un paciente es proporcionando una composición que comprende uno o más anticuerpos anti-esfingolípidos humanizados para unirse a uno o más esfingolípidos, actuando de este modo como "esponjas" terapéuticas que reducen el nivel de esfingolípidos indeseables libres. Cuando un compuesto se denomina "libre", el compuesto no se restringe de ninguna manera de alcanzar el sitio o sitios en los que ejerce sus efectos indeseables. Por lo general, un compuesto libre está presente en sangre y tejido, que, o bien es o que contiene el sitio(s) de acción del compuesto libre, o de los que un compuesto puede migrar libremente a su sitio(s) de acción. Un compuesto libre también puede estar disponible para que actúe sobre cualquier enzima que convierte el compuesto en un compuesto indeseable.

Sin desear quedar ligado por teoría alguna en particular, se cree el nivel de esfingolípidos indeseables tales como SPH o S1P, y/o uno o más de sus metabolitos, provocan o contribuyen al desarrollo de enfermedades y trastornos cardíacos

y de miocardio.

Dado que los esfingolípidos también están implicados en la fibrogénesis y la curación de heridas del tejido hepático (Davaille, y col., J. Biol. Chem. 275: 34268-34633, 2000; Ikeda, y col., Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279: G304-G310, 2000), la curación de vasculaturas heridas (Lee, y col., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278: C612-C618, 2000), y otras patologías o trastornos, o sucesos relacionadas con dichas enfermedades o trastornos, tales como cáncer, angiogénesis, diversas enfermedades oculares se asocian con fibrosis e inflamación excesiva (Pyne y col., Biochem. J. 349: 385-402, 2000), las composiciones y procedimientos de la presente divulgación se pueden aplicar para tratar estas enfermedades y trastornos, así como enfermedades y trastornos cardiacos y del miocardio.

Una forma de terapia basada en esfingolípidos implica la manipulación de las rutas metabólicas de los esfingolípidos con el fin de disminuir las concentraciones reales, relativas y/o disponibles *in vivo* de esfingolípidos indeseables, tóxicos. La invención proporciona composiciones y procedimientos para tratar o prevenir enfermedades, trastornos o traumatismo físico, en las que los anticuerpos anti-esfingolípidos humanizados se administran a un paciente para unirse a, esfingolípidos tóxicos indeseables, o metabolitos de los mismos.

Dichos anticuerpos anti-esfingolípidos humanizados, que son útiles para una diversidad de fines, se pueden formular en una composición farmacéutica, incluyendo el tratamiento de enfermedades, trastornos o traumatismo físico. Las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos anti-esfingolípidos humanizados de la invención se pueden incorporar en kits y dispositivos médicos para dicho tratamiento. Los dispositivos médicos se pueden usar para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención a un paciente con necesidad del mismo, y de acuerdo con una realización de la invención, se proporcionan kits que incluyen dichos dispositivos. Dichos dispositivos y kits se pueden diseñar para la administración de rutina, incluyendo la autoadministración, de las composiciones farmacéuticas de la invención. Dichos dispositivos y kits también se pueden diseñar para uso de emergencia, por ejemplo, en ambulancias o salas de emergencia, o durante la cirugía, o en actividades en las que es posible una adhesión, pero en las que la atención médica completa puede no ser inmediatamente rápida (por ejemplo, senderismo y camping, o situaciones de combate).

Procedimientos de administración.

El tratamiento de enfermedades y afecciones que se analizan en el presente se puede conseguir mediante la administración de agentes y composiciones de la invención mediante diversas vías usando diferentes formulaciones y dispositivos. En la técnica se conocen bien diluyentes, vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. Un experto en la materia observará que las cantidades que se van a administrar para un protocolo de tratamiento en particular se pueden determinar fácilmente. Se podría esperar que las cantidades adecuadas entren dentro del intervalo de 10 µg/dosis a 10 g/dosis, preferentemente dentro de 10 mg/dosis a 1 g/dosis.

Las sustancias farmacológicas se pueden administrar mediante técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a administración sistémica, subcutánea, intradérmica, mucosa, incluyendo por inhalación, y tópica. La mucosa se refiere al tejido epitelial que reviste las cavidades internas del organismo. Por ejemplo, la mucosa comprende el canal de alimentación, que incluye la boca, esófago, estómago, intestinos y ano; el tracto respiratorio, incluyendo las vías nasales, tráquea, bronquios y pulmones; y los genitales. Para el fin de la presente memoria descriptiva, la mucosa también incluye la superficie externa del ojo, es decir, la córnea y la conjuntiva. La administración local (en oposición a la administración sistémica) puede ser ventajosa porque este enfoque puede limitar los efectos secundarios sistémicos potenciales, pero también permite un efecto terapéutico.

Las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una diversidad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

Las formulaciones farmacéuticas usadas en la presente invención se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los principios activos con el vehículo o vehículos o excipiente o excipientes farmacéuticos. Los vehículos preferentes incluyen aquéllos que son farmacéuticamente aceptables, particularmente cuando la composición es para uso terapéutico en seres humanos. Para aplicaciones terapéuticas no humanas (por ejemplo, en el tratamiento de animales de compañía, ganado, peces o aves) se pueden usar vehículos veterinariamente aceptables. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos y, después, si fuera necesario, dando forma al producto.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles, tales como, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas también pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En una realización, las composiciones farmacéuticas se pueden formular y usar como espumas. Las espumas

farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero no limitadas a, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas.

5 Aunque de naturaleza básicamente similar, estas formulaciones varían en los componentes y en la consistencia del producto final. Por lo general, los expertos en las técnicas farmacéutica y de formulación tienen conocimientos sobre la preparación de dichas composiciones y formulaciones y se pueden aplicar a la formulación de las composiciones de la presente invención.

10 En una realización, se puede administrar un resto derivado inmunitario en el ojo mediante, por ejemplo, gotas o pomadas tópicas, inyección periocular, por vía intracameral en la cámara anterior o el cuerpo vítreo, mediante un depósito implantado o por vía sistémica mediante inyección o administración oral. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de anticuerpo usado.

15 Los enfoques tradicionales para administrar agentes terapéuticos en el ojo incluyen aplicación tópica, redistribución en el ojo después de la administración sistémica o inyecciones intraoculares/perioculares directas [Sultana, *y col.* (2006), *Current Drug Delivery*, vol 3: 207-217; Ghate y Edelhauser (2006), *Expert Opinion*, vol 3: 275-287; y Kaur y Kanwar (2002), *Drug Develop Industrial Pharmacy*, vol 28: 473-493]. Anti-S1P u otros agentes terapéuticos con anticuerpos lípidos bioactivos se podrían usar probablemente con cualquiera de estos enfoques aunque todos tienen determinadas ventajas y desventajas. Las gotas tópicas son cómodas, pero se eliminan principalmente porque el drenaje nasolacrimal a menudo libera menos de un 5 % del fármaco aplicado en la sección anterior del ojo y una fracción incluso menor que esa dosis al segmento posterior del globo. Además de gotas, los pulverizadores proporcionan otro modo de administración tópica. Un tercer modo lo constituyen las pomadas o emulsiones oftálmicas que se pueden usar para prolongar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular, aunque la visión borrosa y la inflamación de los párpados pueden ser molestos. Dichos enfoques tópicos todavía son preferentes, ya que la administración sistémica de agentes terapéuticos para tratar trastornos oculares expone todo el organismo a la toxicidad potencial del fármaco.

25 El tratamiento del segmento posterior del ojo es médicamente importante porque la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la uveítis posterior y el glaucoma son causas principales de pérdida de visión en Estados Unidos y en otros países desarrollados. Myles, *y col.* (2005), *Adv Drug Deliv Rev*; 57: 2063-79. El modo más eficaz de administración del fármaco en el segmento posterior es la inyección intravítrea a través de la pars plana. Sin embargo, las inyecciones directas requieren un profesional médico con experiencia para efectuar la administración y pueden causar una ansiedad que limita el tratamiento en muchos pacientes. Las inyecciones perioculares, un enfoque que incluye inyecciones subtenonianas subconjuntival, retrobulbar, peribulbar y posterior son algo menos invasivas que las inyecciones intravítreas. Las inyecciones intravítreas repetidas y a largo plazo pueden producir complicaciones, tales como hemorragia vítrea, desprendimiento de retina o endoftalmitis.

35 El tratamiento con anticuerpos lipídicos bioactivos también se podría administrar usando uno de los sistemas de liberación ocular más recientes [Sultana, *y col.* (2006), *Current Drug Delivery*, vol 3: 207-217; y Ghate y Edelhauser (2006), *Expert Opinion*, vol 3: 275-287], que incluyen sistemas de liberación sostenida o controlada, tales como (a) insertos oculares (solubles, erosionables, no erosionables o basados en hidrogel) , escudos corneanos, por ejemplo vendajes a base de colágeno y lentes de contacto que proporcionan una liberación controlada del fármaco en el ojo, (b) sistemas de gelificación *in situ* que proporcionan facilidad de administración en forma de gotas que se convierten en gel en el ojo, proporcionando de este modo algún efecto sostenido del fármaco en el ojo, (c) sistemas vesiculares tales como liposomas, niosomas/discomas, etc., que ofrecen ventajas de liberación dirigida, biocompatibilidad y libertad de la visión borrosa, (d) sistemas mucoadhesivos que proporcionan una mejor retención en el ojo, (e) profármacos (f) potenciadores de la penetración, (g) sistemas de vehículo liofilizado, (h) partículas, (i) emulsiones submicrométricas, (j) iontoforesis, (k) dendrímeros, (l) microesferas incluyendo microesferas bioadhesivas, (m) nanoesferas y otras nanopartículas, (n) colosomas y (o) sistemas de administración de fármacos que combinan uno o más de los sistemas indicados anteriormente para proporcionar un efecto beneficioso adicional, o incluso sinérgico. La mayoría de estos enfoques se dirigen al segmento anterior del ojo y pueden ser beneficiosos para tratar la enfermedad del segmento anterior. Sin embargo, uno o más de estos enfoques todavía pueden ser útiles al afectar a las concentraciones de lípidos bioactivos en la región posterior del ojo porque los pesos moleculares relativamente bajos de los lípidos probablemente permitan un movimiento considerable de los lípidos en el interior del ojo. Además, el anticuerpo introducido en la región anterior del ojo puede ser capaz de migrar por el ojo, especialmente si se fabrica en una variante del anticuerpo de peso molecular más bajo, como un fragmento Fab. Además, se podrían usar sistemas de liberación sostenida de fármacos para el segmento posterior, tales como los aprobados o en fase de desarrollo (véanse las referencias, mencionadas anteriormente).

55 Tal como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de la enfermedad de la retina posterior, coroides y mácula es médicamente muy importante. [Eljarrat-Binstock y Domb (2006), *Control Release*, 110: 479-89] es un avance importante y puede ofrecer un modo eficaz de liberar anticuerpos en el segmento posterior del ojo.

60 También se podrían añadir al anticuerpo formulado diversos excipientes para mejorar el rendimiento de la terapia, hacer la terapia más cómoda o garantizar claramente que el anticuerpo formulado se usa solo para su finalidad prevista y aprobada. Los ejemplos de excipientes incluyen sustancias químicas para controlar el pH, agentes antimicrobianos, conservantes para prevenir la pérdida de potencia del anticuerpo, colorantes para identificar la

formulación para uso ocular exclusivamente, agentes de solubilización para aumentar la concentración del anticuerpo en la formulación, potenciadores de la penetración y el uso de agentes para ajustar la isotonicidad y/o la viscosidad. Los inhibidores, por ejemplo, de proteasas se podrían añadir para prolongar la vida media del anticuerpo. En una realización, el anticuerpo se libera en el ojo mediante inyección intravítrea en una solución que comprende solución salina tamponada con fosfato a un pH adecuado para el ojo.

El agente anti-S1P (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) también se podría modificar químicamente para producir un profármaco que se administra en una de las formulaciones o dispositivos que se han descrito anteriormente. La forma activa del anticuerpo se libera a continuación mediante la acción de una enzima endógena. Las posibles enzimas oculares a considerar en la presente solicitud son los diversos citocromos p450, aldehído reductasas, cetona reductasas, esterasas o N-acetil- β -glucosamidasa. Otras modificaciones químicas realizadas en el anticuerpo podrían aumentar su peso molecular y, como resultado, aumentar el tiempo de permanencia del anticuerpo en el ojo. Un ejemplo de dicha modificación química es la pegilación [Harris y Chess (2003), *Nat Rev Drug Discov*; 2: 214-21], un procedimiento que puede ser general o específico para un grupo funcional tal como disulfuro [Shaunak, y col. (2006), *Nat Chem Biol*; 2:312-3] o un tiol [Doherty, y col. (2005), *Bioconjug Chem*; 16: 1291-8].

En el presente documento, los ejemplos que siguen a continuación describen la producción de anticuerpos anti-esfingolípidos humanizados y variables con propiedades deseables desde un punto de vista terapéutico, incluyendo afinidad de unión fuerte hacia esfingolípidos. En particular, la invención se dirige a S1P y sus variantes que pueden incluir S1P en sí misma definida como esfingosina-1-fosfato [esfingeno-1-fosfato; D-eritro-esfingosina-1-fosfato; esfing-4-enina-1-fosfato; ácido (E,2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-octa-dec-4-enoxi]fosfónico (AS 26993-30-6). DHS1P se define como dihidroesfingosina-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); SPC es esfingosilfosforil colina, lisoesfingomielina, esfingosilfosfocolina, esfingosina fosforilcolina, etanaminio; 2-(((2-amino-3-hidroxi-4-octadecenil)oxi)hidroxifosfinil)oxi)-N,N,N-trimetil-, cloruro, (R-(R*,S*-(E))), cloruro de 2-(((E,2R,3S)-2-amino-3-hidroxi-octadec-4-enoxi)-hidroxi-fosforil)oxietil 1-trimetil-azanio (CAS 10216-23-6).

25 Generación y caracterización de anticuerpos

En el presente documento, las afinidades de los anticuerpos se pueden determinar tal como se describe en los ejemplos que siguen a continuación. Los anticuerpos humanizados o variables preferentes son los que se unen a un esfingolípido con un valor de K_d no superior a aproximadamente 1×10^{-7} M, preferentemente no superior a aproximadamente 1×10^{-8} M, y lo más preferentemente no superior a 5×10^{-9} M.

Aparte de los anticuerpos con una fuerte afinidad de unión hacia los esfingolípidos, también es deseable seleccionar anticuerpos humanizados o variables que tengan otras propiedades beneficiosas desde un punto de vista terapéutico. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser uno que reduzca la angiogénesis y que altere la progresión del tumor. Preferentemente con el anticuerpo tiene un valor de concentración eficaz 50 (CE50) no superior a aproximadamente 10 μ g/ml, preferentemente no superior a aproximadamente 1 μ g/ml, y lo más preferentemente no superior a aproximadamente 0,1 μ g/ml, tal como se mide en un ensayo directo de ELISA de unión. Preferentemente, el anticuerpo tiene un valor de concentración eficaz no superior a aproximadamente 10 μ g/ml, preferentemente no superior a aproximadamente 1 μ g/ml, y lo más preferentemente no superior a aproximadamente 0,1 μ g/ml, tal como se mide en ensayos celulares en presencia de 1 μ M de S 1 P, por ejemplo, a estas concentraciones, el anticuerpo es capaz de inhibir la liberación de IL-8 inducida por esfingolípidos *in vitro* en al menos un 10 %. Preferentemente, el anticuerpo tiene un valor de concentración eficaz no superior a aproximadamente 10 μ g/ml, preferentemente no superior a aproximadamente 1 μ g/ml, y lo más preferentemente no superior a aproximadamente 0,1 μ g/ml, tal como se mide en el modelo animal de CNV después de quemadura con láser, por ejemplo, a estas concentraciones, el anticuerpo es capaz de inhibir la neovascularización inducida por esfingolípidos *in vivo* en al menos un 50 %.

Los ensayos para determinar la actividad de los anticuerpos anti-esfingolípidos de la invención incluyen ensayos de ELISA tal como se muestra en los ejemplos en lo sucesivo en el presente documento.

Preferentemente, el anticuerpo humanizado o variable fracasa en provocar una respuesta inmunogénica después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo a un paciente humano. Si se provoca una respuesta inmunogénica, la respuesta será preferentemente de modo que el anticuerpo todavía proporcione un beneficio terapéutico al paciente tratado con el mismo.

De acuerdo con una realización de la invención, los anticuerpos anti-esfingolípidos humanizados se unen al "epítipo" tal como se define en el presente documento. Para identificar sistemáticamente anticuerpos que se unen al epítipo en un esfingolípido unido mediante un anticuerpo de interés (por ejemplo, los que bloquean la unión del anticuerpo al esfingolípido), se puede realizar un experimento de bloqueo cruzado de rutina tal como el que se describe en *Antibodies*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, se puede realizar mapeo de epítipos, por ejemplo, tal como se describe en Champe, y col. [*J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995)], para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés.

Los anticuerpos de la invención tienen un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada con la fórmula: FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4, en la que "FR1-4" representa

las cuatro regiones marco conservadas y "CDRH1-3" representa las tres regiones hipervariables de un dominio variables de cadena pesada de anticuerpo. FR1-4 se puede derivar de una "secuencia consenso" (por ejemplo, los aminoácidos más comunes de una clase, subclase o subgrupos de cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas humanas) tal como en los ejemplos que siguen a continuación o se puede derivar de una región marco conservada de anticuerpo humano individual o de una combinación de diferentes secuencias de región marco conservada. Muchas secuencias región marco conservada de anticuerpo humano se recopilan en Kabat, y *col.*, mencionado anteriormente, por ejemplo. En una realización, la FR pesada variable se proporciona mediante una secuencia consenso de un subgrupo de inmunoglobulina humana tal como se recopila en Kabat, y *col.*, mencionado anteriormente. Preferentemente, el subgrupo de inmunoglobulina humana es el subgrupo III de cadena pesada humana (por ejemplo, tal como en la SEC ID N°: 16).

La secuencia de FR pesada variable humana tiene preferentemente una o más sustituciones en la misma, por ejemplo, en la que el resto FR humano se sustituye con un resto no humano correspondiente (por "resto no humano correspondiente" se entiende el resto no humano con la misma numeración posicional de Kabat que el resto humano de interés cuando las secuencias humanas y no humanas se alinean), pero la sustitución con el resto no humano no es necesaria. Por ejemplo, un resto de FR de sustitución distinto de los restos no humanos correspondientes se puede seleccionar mediante presentación de fagos. Ejemplos de restos de FR pesada variable que se pueden sustituir incluyen uno cualquiera o más de los números de restos de FR: 37H, 49H, 67H, 69H, 71H, 73H, 75H, 76H, 78H, 94H (aquí se usa la numeración de restos de Kabat). Preferentemente, al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro de estos restos están sustituidos. Una combinación particularmente preferente de sustituciones de FR es: 49H, 69H, 71H, 73H, 76H, 78H, y 94H. Con respecto a las regiones hipervariables de cadena pesada, éstas tienen preferentemente las secuencias de aminoácidos que se enumeran en la Tabla 2, que sigue a continuación.

Los anticuerpos de la realización preferente en el presente documento tienen un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada con la fórmula: FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4, en la que "FR1-4" representa las cuatro regiones marco conservadas y "CDRL1-3" representa las tres regiones hipervariables de un dominio pesado variable de anticuerpo anti-esfingolípido. FR1-4 se puede derivar de una "secuencia consenso" (por ejemplo, los aminoácidos más comunes de una clase, subclase o subgrupo de cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas humanas) tal como en los ejemplos que siguen a continuación o se puede derivar de una región marco conservada de anticuerpo humano individual o de una combinación de diferentes secuencias de la región marco conservada. En una realización preferente, la FR ligera variable se proporciona mediante una secuencia consenso de un ser subgrupo de inmunoglobulina humana tal como se recopila en Kabat, y *col.*, mencionado anteriormente. Preferentemente, el subgrupo de inmunoglobulina humana es el subgrupo I de cadenas ligeras kappa humana (por ejemplo, tal como en la SEC ID N°: 17).

La secuencia de FR ligera variable humana tiene preferentemente sustituciones en la misma, por ejemplo, en la que un resto de FR humana se sustituye con un resto de ratón correspondiente, pero la sustitución con el resto no humano no es necesaria. Por ejemplo, un resto de sustitución que no sea el resto no humano correspondiente se puede seleccionar mediante presentación en fagos. Ejemplos de restos de FR ligera variable que se pueden sustituir incluyen uno cualquiera o más de los números de restos de FR, que incluyen, pero no se limitan a, F4, Y36, Y49, G64, S67.

Con respecto a las CDR, éstas tienen preferentemente las secuencias de aminoácidos que se enumeran en la Tabla 2, que sigue a continuación.

Los procedimientos para generar anticuerpos anti-esfingolípidos humanizados de interés en el presente documento se elaboran con más detalle a continuación.

A. Preparación de Anticuerpos

Los procedimientos para humanizar anticuerpos anti-esfingolípidos no humanos y generar variantes de anticuerpos anti-esfingolípidos se describen en los Ejemplos que siguen a continuación. Para humanizar un anticuerpo anti-esfingolípido, se prepara el material de partida de anticuerpo no humano. Cuando se va a generar una variante, se prepara el anticuerpo precursor. Las técnicas a modo de ejemplo para generar dicho material de partida de anticuerpos lo humano y anticuerpos precursores se describirán en las secciones siguientes.

(i) Preparación de Antígenos.

El antígeno esfingolípido a usar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, esfingolípido intacto o una porción de un esfingolípido (por ejemplo, un fragmento de esfingolípido que comprende un "epítipo"). Otras formas de antígenos útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia. el antígeno del esfingolípido usado para generar el anticuerpo, se describen los ejemplos que siguen a continuación. En una realización, el antígeno es una forma derivatizada del esfingolípido, y se puede asociar con una proteína vehículo.

(ii) Anticuerpos Policlonales.

Los anticuerpos policlonales se aumentan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de

suero, tiroglobulina bovina, o inhibidores de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R^1 son diferentes grupos alquilo.

5 Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados por combinación, por ejemplo, de 100 ug o 5 ug de la proteína o el conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con tres volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales se estimulan con 0,1 a 0,2 veces la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días después, se extrae sangre a los animales y el suero se somete a ensayo para la titulación de anticuerpos. Los animales se estimulan hasta que se estabiliza la titulación. Preferentemente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero se conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Además, los conjugados se pueden fabricar en cultivo celular recombinante como fusiones de proteinasas. Además, se pueden usar adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para aumentar la respuesta inmune.

15 (iii) Anticuerpos Monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el procedimiento del hibridoma descrito primero por Kohler, y col., Nature, 256: 495 (1975), o por otros procedimientos adecuados, incluyendo mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o mono macaco, se inmuniza tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento para obtener linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

25 Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma precursoras sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas por lo general incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

30 Las células de mieloma referentes son las que se fusionan de forma eficaz, soportan la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferentes son líneas de mieloma de murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOP-21 y M.C.-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. Estados Unidos, y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Md. Estados Unidos. Además, se han descrito líneas celulares de heteromieloma de mieloma humano y de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur, y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

40 El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están creciendo se someter a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson, y col., Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

45 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y crecer mediante procedimientos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este sin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

50 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

55 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se podría colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario

de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá a continuación con más detalle.

(iv) Humanización y Variantes de Secuencias de Aminoácidos.

5 El Ejemplo 12, que sigue a continuación, describe procedimientos para la humanización de un anticuerpo anti-esfingolípido. Procedimientos generales o humanización se describe, por ejemplo, en los documentos de patente US5861155, US19960652558, US6479284, US20000660169, US6407213, US19930146206, US6639055, US20000705686, US6500931, US19950435516, US5530101, S5585089, US19950477728, US5693761, US 19950474040, US5693762, US 19950487200, US6180370, US 19950484537, US2003229208, US20030389155, 10 US5714350, US19950372262, US6350861, US19970862871, US5777085, US19950458516, US5834597, US19960656586, US5882644, US19960621751, US5932448, S19910801798, US6013256, US19970934841, US6129914, US19950397411, US6210671, US6329511, S19990450520, US2003166871, US20020078757, US5225539, US19910782717, US6548640, US19950452462, US5624821, y US19950479752. En determinadas realizaciones, puede ser deseable generar variantes de secuencias de aminoácidos de estos anticuerpos 15 humanizados, particularmente cuando éstos mejoran la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo humanizado. El Ejemplo 12 describe metodologías para generar variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo anti-esfingolípido con mayor afinidad con respecto al anticuerpo precursor.

Las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-esfingolípido se preparan por introducción de cambios de los nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo anti-esfingolípido, o por síntesis de péptidos. Dichas variantes 20 incluyen, por ejemplo, supresiones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-esfingolípidos de los ejemplos en el presente documento. Se prepara cualquier combinación de supresión, inserción, y sustitución para llegar al constructo final, con la condición de que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos de traducción posterior del anticuerpo anti-esfingolípido humanizado o variable, tales como el cambio del número o la 25 posición de los sitios de glicosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo anti-esfingolípido que son ubicaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina", tal como se describe en Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). En el presente documento, se identifica un resto o 30 grupos de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno de esfingolípido. Esos lugares de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque se determine previamente el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el 35 rendimiento de una mutación en un sitio dado, la exploración de ala o la mutagénesis aleatoria se realiza en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos anti-esfingolípidos expresadas se identifican sistemáticamente para detectar la actividad deseada. Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxil-terminales cuya longitud varía desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Ejemplos de inserciones terminales 40 incluyen un anticuerpo anti-esfingolípido con un resto de metionilo N-terminal del anticuerpo fusionado a una marca de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo anti-esfingolípido incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo anti-esfingolípido de una enzima o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo anti-esfingolípido eliminado y un resto diferente insertado en su lugar. Los 45 sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de la FR. Las sustituciones conservadoras son sustituciones preferentes. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados sustituciones "a modo de ejemplo" que se enumeran a continuación, o tal como se describe adicionalmente en referencia a las clases de aminoácidos, e identificar sistemáticamente los productos.

50

Tabla 1: Sustituciones de Restos de Aminoácidos A Modo de Ejemplo

Resto de aminoácido (símbolo)	Sustituciones a modo de ejemplo
Ala (A)	val; leu; ile val
Arg (R)	lys; gln; asn lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln arg
Asp (D)	glu; asn glu
Cys (C)	ser; ala ser
Gln (Q)	asn; glu asn
Glu (E)	asp; gln asp
Gly (G)	ala ala
His (H)	asn; gln; lys; arg arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; leu phe; norleucina
Leu (L)	norleucina; ile; val; ile met; ala; phe
Lys (K)	arg; gln; asn arg
Met (M)	leu; phe; ile leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr tyr
Pro (P)	ala ala
Ser (S)	thr thr
Thr (T)	ser ser
Trp (W)	tyr; phe tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; leu ala; norleucina

Las modificaciones básicas en las propiedades biológicas del anticuerpo se consiguen por selección de sustituciones que difieren de forma significativa en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos en base a propiedades comunes de la cadena lateral:

- 5
- (1) hidrófoba: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófila neutra: cys, ser, thr;
- 10 (3) ácida: asp, glu;
- (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromática: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

- 15 También se puede sustituir cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-esfingolípido humanizado o variable, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación anómala. Por el contrario, se pueden añadir al anticuerpo enlace o enlaces de cisteína para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento de Fv).

- 20 Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Por lo general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán mayores propiedades biológicas con respecto al anticuerpo precursor a partir de que se generan. Una forma conveniente de generar dichas variantes de sustitución es la maduración por afinidad usando presentación de fagos. En resumen, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones de amino posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generados de este modo se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto de M13 del gen III empacado dentro de cada partícula. A continuación las variantes que
- 25

presentan fagos se identifican sistemáticamente para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se divulga en el presente documento. Para identificar los sitios candidatos para la modificación de la región hipervariable, se puede realizar mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos de la región hipervariable que constituyen de fama significativa a la unión al antígeno. Como alternativa, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el esfingolípido. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a identificación sistemática tal como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para el desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Alteración significa la supresión de uno o más grupos de hidratos de carbono encontrados en el anticuerpo, y/o adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

Por lo general, la glicosilación de anticuerpos está unida a N y/o unida a O. Unida a N se refiere a la del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento más habituales para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crean un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas que se han descrito anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también se puede hacer mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-esfingolípido se preparan mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-esfingolípido.

(v) Anticuerpos Humanos.

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, en la actualidad es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de matrices de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la estimulación con antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits, y col., Nature, 362: 255-258(1993); Bruggermann, y col., Year in Immuno., 7:33 (1993); y Patentes de Estados Unidos N° 5.591.669, N° 5.589.369 y N° 5.545.807. Además, los anticuerpos humanos se pueden derivar de bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom, y col., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks, y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); y Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332 y N° 5.573.905). Tal como se ha analizado anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y N° 5.229.275) o mediante otros procedimientos adecuados.

(vi) Fragmentos de Anticuerpos.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-esfingolípido humanizado o variable es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto, y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117(1992); y Brennan, y col., Science 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir en la actualidad directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos de $F(ab')_2$ (Carter, y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). En otra realización, el $F(ab')_2$ se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para estimular el ensamblaje de la molécula de $F(ab')_2$. De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar fragmentos de Fv; Fab o $F(ab')_2$ directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia.

(vii) Anticuerpos Multiespecíficos.

En algunas realizaciones, se puede desear la generación de anticuerpos anti-esfingolípidos humanizados o variables multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) que tienen especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo se pueden unir a dos epítomos diferentes del esfingolípido. Como alternativa, una rama de anti-esfingolípido se puede combinar con una rama que se une a una molécula diferente. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de $F(ab')_2$).

De acuerdo con otro enfoque para fabricar anticuerpos biespecíficos, se puede diseñar la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La superficie de contacto preferente comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.731.168.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica, y se divulgan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Además, en la bibliografía se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan, y col., Science 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se cortan proteolíticamente para generar fragmentos de $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito sódico, agente complejante de ditiol para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos de Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB se reconvierte a continuación en Fab' -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas. Además, en una realización adicional, los fragmentos de Fab' -SH recuperados directamente de *E. coli* se pueden acoplar químicamente *in vitro* para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby, y col., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992).

Además, se han descrito diversas técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny, y col., J. Immunol. 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión genética. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede usar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de una sola cadena (sFv). Véase, por ejemplo, Gruber, y col., J. Immunol. 152: 5368 (1994). Como alternativa, el anticuerpo biespecífico puede ser un "anticuerpo lineal" producido tal como se describe, por ejemplo, en Zapata, y col. Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995).

Además, se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., J. Immunol. 147: 60 (1991).

En el presente documento, un anticuerpo (o polímero o polipéptido) de la invención que comprende uno o más sitios de unión por rama o fragmento del mismo se denominará anticuerpo "polivalente". Por ejemplo, un anticuerpo "bivalente" de la invención comprende dos sitios de unión por Fab o fragmento del mismo mientras que un polipéptido "trivalente" de la invención comprende tres sitios de unión por Fab o fragmento del mismo. En un polímero polivalente de la invención, los dos o más sitios de unión por Fab de unión se pueden unir a los mismos o diferentes antígenos. Por ejemplo, los dos o más sitios de unión en un polipéptido polivalente de la invención se pueden dirigir frente al mismo antígeno, por ejemplo, frente a las mismas partes o diferentes o epítomos de dicho antígeno o frente a dos o más partes iguales o diferentes o epítomos de dicho antígeno; y/o se pueden dirigir frente a diferentes antígenos; o una combinación de los mismos. Por lo tanto, un polipéptido bivalente de la invención, por ejemplo, puede comprender dos

sitios de unión idénticos, puede comprender un primer sitio de unión dirigido frente a una primera parte o un epítipo de un antígeno y un segundo sitio de unión dirigido frente a la misma parte o un epítipo de dicho antígeno o frente a la otra parte o un epítipo de dicho antígeno; o puede comprender un primer sitio de unión dirigidos frente a una primera parte o un epítipo de un antígeno y un segundo sitio de unión dirigido frente a un antígeno diferente. Sin embargo, tal como será evidente a partir de la descripción anterior en el presente documento, la invención no se limita a la misma, en el sentido de que un polipéptido polivalente de la invención puede comprender cualquier número de sitios de unión dirigidos frente al mismo o diferentes antígenos.

Un anticuerpo (o polímero o polipéptido) de la invención que contiene al menos dos sitios de unión por Fab o fragmento del mismo, en el que al menos un sitio de unión se dirige frente a un primer antígeno y un segundo sitio de unión se dirige frente a un segundo antígeno diferente del primer antígeno, también se denominará "multiespecífico". Por lo tanto, un polímero "bienespecífico" comprende al menos un sitio dirigido frente a un primer antígeno y al menos un segundo sitio dirigido frente a un segundo antígeno, mientras que un "triespecífico" es un polímero que comprende al menos un sitio de unión dirigido frente a un primer antígeno, al menos un sitio de unión adicional dirigido frente a un segundo antígeno, y al menos un sitio de unión adicional dirigido frente a un tercer antígeno, etc. Por consiguiente, en sus formas más simples, un polipéptido bienespecífico de la invención es un polipéptido bivalente (por Fab) de la invención. Sin embargo, tal como será evidente a partir de la descripción anterior en el presente documento, la invención no se limita a la misma, en el sentido de que un polipéptido multiespecífico de la invención puede comprender cualquier número de sitios de unión dirigidos frente a dos o más antígenos diferentes.

(viii) Otras Modificaciones.

Se contemplan otras modificaciones del anticuerpo anti-esfingolípido humanizado o variable. Por ejemplo, la invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo que se describe en el presente documento conjugado con un agente citotóxico, tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (por ejemplo, un radioconjugado). Los conjugados se fabrican usando una diversidad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis(p-diazoniobenzoil) etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno).

Los anticuerpos anti-esfingolípidos que se divulgan en el presente documento también se pueden formular como inmunoconjugados. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en Epstein y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang, y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); y Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y N° 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se divulgan en la Patente de Estados Unidos. N° 5.013.556. Por ejemplo, los liposomas se pueden generar mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos de Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin, y *col.*, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Otro principio activo está contenido opcionalmente dentro del liposoma.

Las enzimas u otros polipéptidos se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-esfingolípidos por técnicas bien conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales que se han analizado anteriormente. Como alternativa, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención unido a por lo menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención se pueden construir usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger, y *col.*, Nature 312: 604-608 (1984)).

En determinadas realizaciones de la invención, puede ser deseable el uso de un fragmento de anticuerpo, en lugar de un anticuerpo intacto, para aumentar la penetración de células y tejidos diana, por ejemplo. En este caso, puede ser deseable modificar el fragmento de anticuerpo con el fin de aumentar su vida media en suero. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor salvaje en el fragmento de anticuerpo (por ejemplo, por mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o mediante la incorporación del epítipo en una marca peptídica que a continuación se fusiona al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el medio, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o peptídicas). Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.096.871.

Las modificaciones covalentes del anticuerpo anti-esfingolípido humanizado o variable también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Se pueden fabricar por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar los restos de aminoácidos diana del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N- o C-terminales. Las modificaciones covalentes de polipéptidos a modo de ejemplo se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.534.615, que se

incorpora específicamente en el presente documento por referencia. Un tipo preferente de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera que se expone en la Patente de Estados Unidos N° 4.640.835; N° 4.496.689; N° 4.301.144; N° 4.670.417; N° 4.791.192 o N° 4.179.337.

5 B. Vectores. Células Huésped y Procedimientos Recombinantes

La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican el anticuerpo anti-esfingolípido humanizado o variable, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico, y técnica recombinantes para la producción del anticuerpo.

10 Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se puede aislar e insertar en un vector replicable para la clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. En otra realización, el anticuerpo se puede producir por recombinación homóloga, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.204.244. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos
15 vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.534.615.

20 Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores en el presente documento son las células procariontas, de levadura o eucariotas superiores que se han descrito anteriormente. Los procariontas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis*), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es 294 de *E. coli* (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como B de *E. coli*, X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537), y W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes.

25 Además de procariontas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o de expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo anti-esfingolípido. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es el más usado comúnmente entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. arxianus*; *Yarrowia* (documento de patente EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento de patente EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento de patente EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyptocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

30 Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos anti-esfingolípidos glicosilados se derivan de organismos pluricelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped de insectos permisivos, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una diversidad de cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la Cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus se pueden usar en el presente documento como el virus de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Además, se pueden usar cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también.

35 Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o 293 células subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham, y col., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather, y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los expresión vectores de de expresión o de clonación que se han descrito anteriormente para la producción de anticuerpos anti-esfingolípidos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para la inducción de promotores, selección de transformantes, o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

5 Las células huésped usadas para producir el anticuerpo anti-esfingolípido de la presente invención se pueden cultivar en una diversidad de medios. Los medios disponibles en el mercado, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son apropiados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios que se describen en Ham, y *col.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes, y *col.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 10 N° 4.657.866; N° 4.927.762; N° 4.560.655; o N° 5.122.469, documento de patente WO 90/03430; documento de patente WO 87/00195; o Re. de Pat. de Estados Unidos N° 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y 15 timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en concentraciones finales en el rango micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Además, se puede incluir cualquier otro suplemento necesario en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las usadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para 20 el experto habitual en la materia.

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los restos de partículas, bien células huésped o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o 25 ultrafiltración. Carter, y *col.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran generalmente primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de filtración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un 30 inhibidor de proteasas tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la 35 técnica de purificación preferente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas (Lindmark, y *col.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss, y *col.*, EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es lo más frecuentemente agarosa, pero hay otras 40 matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una 45 resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio también dependiendo del anticuerpo a recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrofóbica a pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4.5, realizada preferentemente a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, sal a 50 aproximadamente 0-0,25 M).

C. Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de un anticuerpo o resto derivado inmune de la invención se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o 55 estabilizantes fisiológicamente aceptables (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de benetonio; alcohol de fenol, de butilo o de bencilo; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; 60 catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros

5 hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación en particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para la finalidad pretendida.

10 Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli(metil-metacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por ejemplo mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo periodo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace intermolecular S-S a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones específicas de matriz de polímero.

35 D. Usos No terapéuticos de los Anticuerpos

Los anticuerpos de la invención se pueden usar como agentes de purificación por afinidad. En este procedimiento, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el esfingolípido a purificar, y posteriormente el soporte se lava con un disolvente adecuado que retirará básicamente todo el material en la muestra excepto el esfingolípido, que se une al anticuerpo inmovilizado. Por último, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, por ejemplo entre pH 3 y pH 5,0, que liberará el esfingolípido del anticuerpo.

Además, los anticuerpos anti-esfingolípidos pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico de esfingolípidos, por ejemplo, detectando su expresión en células específicas, tejidos (tales como muestras de biopsia), o fluidos corporales. Dichos procedimientos de diagnóstico pueden ser útiles en el diagnóstico de una enfermedad o trastorno cardiovascular o cerebrovascular.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo se marcará por lo general con un resto detectable. Están disponibles numerosas marcas, que generalmente se pueden agrupar en las siguientes categorías:

50 (a) Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I . El anticuerpo se puede marcar con el radioisótopo usando las técnicas que se describen en Current Protocols in Immunology, Volúmenes 1 y 2, Coligen y col., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., Pubs. (1991), por ejemplo, y la radiactividad se puede medir usando recuento por centelleo.

55 (b) Están disponibles marcas fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lisamina, ficoeritrina y Rojo Texas. Las marcas fluorescentes se pueden conjugar con el anticuerpo usando las técnicas que se divulgan en Current Protocols in Immunology, mencionado anteriormente, por ejemplo. La fluorescencia se puede cuantificar usando un fluorímetro.

(c) Se encuentran disponibles diversos marcadores enzima-sustrato se encuentran disponibles. Por ejemplo, la Patente de de Estados Unidos N° 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de éstos. Por lo general, la

enzima cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y a continuación puede emitir luz que se puede medir (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente de Estados Unidos N° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tales como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), heterociclicoxidasas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan y *col.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone y H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73: 147-166 (1981).

15 Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

- (i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como un sustrato, en el que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB));
- (ii) fosfatasa alcalina (AP) con Fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico 4-metil-umbeliferil- β -D-galactosidasa.

Otras numerosas combinaciones de enzima-sustrato están disponibles para los expertos en la materia. Para una revisión general de éstas, véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.275.149 y N° 4.318.980.

25 En ocasiones, la marca se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El experto en la materia estará informado de diversas técnicas para conseguir ésto. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente se pueden conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y por lo tanto, la marca se puede conjugar con el anticuerpo de esta manera indirecta. Como alternativa, para conseguir la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcas que se han mencionado anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, se puede conseguir la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo.

En otra realización de la invención, no es necesario marcar el anticuerpo anti-esfingolípido, y la presencia del mismo se puede detectar usando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo anti-esfingolípido.

35 Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Véase, por ejemplo, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, páginas 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

40 Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de ensayo por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de esfingolípido en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón unido, los anticuerpos generalmente son insolubles antes o después de la competición, de modo que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos se pueden separar convenientemente del patrón y el analito que permanecen sin unir.

45 Los ensayos de sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epitopo, de la proteína a detectar. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une mediante un primer anticuerpo que se inmoviliza sobre un soporte sólido, y después un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.376.110. El segundo anticuerpo se puede marcar por sí mismo con un resto detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se marca con un resto detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo de ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

Para la inmunohistoquímica, la muestra de sangre o tejido puede ser fresca o congelada o puede estar embebida en parafina y fijada con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

55 Los anticuerpos también se pueden usar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, el anticuerpo se marca con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P , o ^{35}S) de manera que la molécula diana unida se puede localizar usando inmunocentelleografía.

E. Kits de Diagnóstico

Como cuestión de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención se pueden proporcionar en un kit, por ejemplo, una combinación de reactivos embasados en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, generalmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

F. Usos Terapéuticos del Anticuerpo

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos anti-esfingolípidos de la invención se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable tales como las que se han analizado anteriormente, incluyendo las que se pueden administrar a un ser humano por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se ha definido anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico que trata. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria o semanal habitual podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 20 mg/kg o más, dependiendo de los factores que se han mencionado anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales, que incluyen, por ejemplo, formación de imágenes radiográficas.

De acuerdo con otra realización de la invención, la eficacia del anticuerpo en la prevención o tratamiento de la enfermedad puede mejorar administrando el anticuerpo en serie o en combinación con otro agente que es eficaz para esos fines, tales como fármacos quimioterapéuticos anticáncer, por ejemplo. Dichos otros agentes pueden estar presentes en la composición que se administra o se pueden administrar por separado. El anticuerpo se administra adecuadamente en serie o en combinación con el otro agente.

G. Artículos de Fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos que se han descrito anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el tratamiento de la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-esfingolípidos. La etiqueta en, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

La invención se entenderá mejor por referencia a los Ejemplos siguientes.

50 Ejemplos

Ejemplo 1: Anticuerpo Monoclonal Murino para S1P (Sphingomab™: LT1002)

Un tipo de anticuerpo terapéutico se une específicamente a esfingolípidos no deseables para conseguir efectos beneficiosos tales como, por ejemplo, (1) reducir la concentración eficaz de esfingolípidos tóxicos, no deseables (y/o la concentración de sus precursores metabólicos) que estimularían un efecto no deseable tal como un efecto cardiotóxico, tumorigénico, o angiogénico; (2) inhibir la unión de un esfingolípidos no deseable, tóxico, tumorigénico, o angiogénico a un receptor celular del mismo, y/o disminuir la concentración de un esfingolípidos que está disponible

para la unión a dicho receptor. Los ejemplos de dichos efectos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, el uso de anticuerpos anti-S 1 P para disminuir la eficacia de la concentración en suero *in vivo* de la S1P disponible, bloqueando de este modo o al menos limitando los efectos tumorigénicos y angiogénicos de S1P y su papel en la insuficiencia cardíaca después de MI, cáncer, o enfermedades fibrogénicas.

- 5 Se sintetizó S1P tiolada para contener un grupo reactivo capaz de reticulación de las características estructurales esenciales de S1P a una molécula vehículo tal como KLH. Antes de la inmunización, el análogo tio-S1P se conjugó a través de reticulación de IOA o SMCC para vehículos de proteína (por ejemplo, KLH) utilizando protocolos convencionales. SMCC es un agente de reticulación heterobifuncional que reacciona con aminas primarias y grupos sulfhidrilo, y representa un agente de reticulación preferente.
- 10 Ratones Swiss Webster o BALB-C se inmunizaron cuatro veces durante un período de dos meses con 50 µg de inmunógeno (conjugado facilitado por SMCC de S1P tiolada y KLH) por inyección. Las muestras de suero se recogieron dos semanas después de las segunda, tercera, y cuarta inmunizaciones y se identificaron sistemáticamente mediante ELISA directo para la presencia de anticuerpos anti-S1P. Los bazo de los animales que mostraron altos títulos de anticuerpo se usaron posteriormente para generar hibridomas mediante procedimientos convencionales de fusión. Los hibridomas resultantes se cultivaron hasta confluencia, después de lo cual el sobrenadante celular se recogió para el análisis de ELISA. De los 55 ratones que se inmunizaron, 8 eran buenos respondedores, mostrando títulos séricos significativos de anticuerpos reactivos a S1P. Las fusiones se realizaron posteriormente usando los bazo de estos ratones y células de mieloma de acuerdo con los procedimientos establecidos. Los 1.500 hibridomas resultantes se identificaron sistemáticamente mediante ELISA directo, produciendo 287 hibridomas positivos. De estos 287 hibridomas seleccionados mediante ELISA directo, 159 mostraron títulos significativos. A continuación, cada uno de los 159 hibridomas se propagó en placas de 24 pocillos. A continuación, los medios acondicionados con células de los hibridomas propagados se volvieron a identificar sistemáticamente para identificar hibridomas estables capaces de secretar anticuerpos de interés. Se realizaron ELISA competitivos en los 60 hibridomas estables con el título más elevado.
- 25 De los 55 ratones y casi 1.500 hibridomas identificados sistemáticamente, se descubrió un hibridoma que presentaba características de rendimiento que justificaban la clonación de dilución limitada, tal como se requiere para generar en última instancia, un anticuerpo monoclonal cierto. Este procedimiento proporcionó 47 clones, la mayoría de los cuales se consideraron positivos para la producción de anticuerpos S1P. De estos 47 clones, 6 se propagaron en placas de 24 pocillos y posteriormente se identificaron sistemáticamente por ELISA competitivo. De los 4 clones que permanecieron positivos, se seleccionó uno para iniciar la producción a gran escala del anticuerpo monoclonal S1P. Los ratones SCID se inyectaron con estas células y la ascitis resultantes eran proteína A-purificado (rendimiento de un 50 %) y se analizaron para los niveles de endotoxina (< 3 EU/mg). Para una ronda de producción de ascitis, se inyectaron 50 ratones, produciendo un total de 125 ml de ascitis. Se determinó el isotipo de los anticuerpos como IgG1 kappa, y se consideraron con una pureza > 95 % por HPLC. El anticuerpo se preparó en fosfato sódico 20 mM con cloruro sódico 150 mM (pH 7,2) y se almacenó a -70 °C. Este anticuerpo se denomina LT1002 o Sphingomab™.
- 30
- 35

El clon del hibridoma positivo (denominado clon 306D326.26) se depositó en la ATCC (número de almacenamiento de depósito de seguridad SD-5362), y representa el primer mAb murino dirigido frente a S1P. El clon también contiene las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo que se podrían usar para la generación de una variante de anticuerpo "humanizado", así como la información de la secuencia necesaria para construir un anticuerpo quimérico.

40

La identificación sistemática de suero y sobrenadante celular para anticuerpos específicos de S1P se hizo con ELISA directo usando un análogo de S1P tiolada como antígeno. Se realizó un patrón de ELISA, tal como se describe a continuación, excepto en que se diluyeron 50 µl de la muestra (suero o sobrenadante celular) con un volumen igual de PBS/Tween-20 al 0,1% (PBST) durante la incubación primaria. Los ELISA se realizaron en placas de 96 pocillos para ELISA de unión elevada (Costar) revestidas con 0,1 µg de S1P tiolada sintetizada químicamente conjugada con BSA en tampón de unión (Na₂CO₃ 33,6 mM, NaHCO₃ 100 mM; 9,5 pH). La S1P tiolada-BSA se incubó a 37 °C durante 1 h a 4 °C durante la noche en los pocillos de la placa para ELISA. A continuación, las placas 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 hora a temperatura ambiente. Para la etapa de incubación primaria, se incubaron 75 µl de la muestra (que contiene la S1P a medir) con 25 µl de 0,1 µg/ml de mAb anti-S1P diluido en PBST y se añadió a un pocillo de la placa para ELISA. Cada muestra se realizó en pocillos por triplicado. Después de una 1 hora de incubación a temperatura ambiente, las placas de ELISA se lavaron cuatro veces con PBS y se incubaron con 100 µl por pocillo de 0,1 µg/ml de HRP de cabra anti-ratón secundario (Jackson Immunoresearch) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron cuatro veces con PBS y se expusieron a tetrametiltencidina (Sigma) durante 1-10 minutos. La reacción de detección se detuvo mediante la adición de un volumen igual de H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica de las muestras se determinó por medición a 450 nm usando un lector de placas EL-X-800 para ELISA (Bio-Tech).

45

50

55

Para la reactividad cruzada, se realizó un ELISA competitivo tal como se ha descrito anteriormente, excepto por las siguientes modificaciones. La incubación primaria consistía en el competidor (S1P, SPH, LPA, etc.) y un mAb anti-S1P conjugado con biotina. La biotilación del anticuerpo monoclonal purificado se realizó usando el kit EZ-Link Sulfo-NHS-biotilación (Pierce). La incorporación de biotina se determinó de acuerdo con el protocolo del kit y varió de 7 a 11 moléculas de biotina por anticuerpo. El competidor se preparó tal como sigue a continuación: las poblaciones de

60

lípidos se sonicaron y se secaron en atmósfera de argón antes de la reconstitución en DPBS/BSA [1 mg/ml de BSA sin ácido graso (Calbiochem) en DPBS (Invitrogen 14040-133)]. Se diluyó mAb anti-S1P purificado según era necesario en PBS/Triton X-100 al 0,5 %. Se mezclaron soluciones de competidor y anticuerpos en conjunto con el fin de generar 3 partes de competidor a 1 parte de anticuerpo. Se usó un anticuerpo secundario de estreptavidina conjugada con HRP (Jackson Immunoresearch) para generar la señal.

Otro aspecto de los datos de ELISA competitiva (que se muestra en la Figura 1, panel A) es que muestra que el mAb anti-S1P era incapaz de distinguir el análogo de la S1P tiolada de la S1P natural que se añadió en el experimento de competición. También demuestra que el anticuerpo no reconoce ningún producto de oxidación dado que el análogo se construyó sin ningún doble enlace. El mAb anti-S1P también se sometió al ensayo frente al producto natural que contenía el doble enlace que se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 48 horas. HPLC de fase inversa de la S1P natural se realizó de acuerdo con los procedimientos que se han indicado anteriormente (Deutschman, y col. (julio de 2003), Am Heart J., vol. 146 (1): 62-8), y los resultados no mostraron diferencia en el tiempo de retención. Además, una comparación de las características de unión del anticuerpo monoclonal a los diversos lípidos que se muestran en la Figura 1, panel A, indica que el epítipo reconocido por el anticuerpo no implica la cadena de hidrocarburo en la región del doble enlace de la S1P natural. Por otro lado, el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal es la región que contiene el amino alcohol en la cadena principal de base de esfingosina más el fosfato libre. Si el fosfato libre se une con una colina (tal como es el caso con SPC), entonces, la unión se reducía en cierto modo. Si el grupo amino está esterificado con un ácido graso (tal como es el caso con C1P), no se observó unión de anticuerpo. Si la cadena principal de alcohol amino esfingosina se sustituye por una cadena principal de glicerol (tal como es el caso con LPA), allí el anticuerpo monoclonal específico para S1P no mostró ninguna unión. Estos datos de mapeo de epítipos indican que solamente hay un epítipo en S1P reconocido por el anticuerpo monoclonal, y que este epítipo se define por el grupo de una sola cabeza polar de S1P.

En un experimento similar que usa medidas de ELISA, se evaluaron los materiales de control adecuados para garantizar que este anticuerpo monoclonal anti-S1P no reconocía ni a la proteína transportadora ni al agente de reticulación. Por ejemplo, el agente de reticulación SMCC normal, se intercambió por IOA en la conjugación de la S1P tiolada con BSA como el material de deposición en el ELISA. Cuando se usó IOA, las características de unión del anticuerpo eran casi idénticas a cuando se usó BSA-SMCC-S1P tiolada. De forma análoga, KLH se intercambió por BSA como la proteína que formaba complejo con S1P tiolada como el material de deposición. En este experimento, tampoco hubo ninguna diferencia significativa en las características de unión del anticuerpo.

Cinética de unión: La cinética de unión de S1P a su receptor u otros restos, tradicionalmente, ha sido problemática debido a la naturaleza de los lípidos. Se han asociado muchos problemas con la insolubilidad de los lípidos. Para medidas de BIAcore, estos problemas se superaron inmovilizando directamente S1P a un chip de BIAcore. A continuación, el anticuerpo se hizo fluir sobre la superficie del chip y se midieron las alteraciones de la densidad óptica para determinar las características de unión del anticuerpo a S1P. Para eludir el carácter de unión bivalente de los anticuerpos, S1P se aplicó sobre el chip en bajas densidades. Además, el chip se revistió con diversas densidades de S1P (7, 20, y 1000 RU) y los datos de unión de los anticuerpos se ajustó de forma global a un modelo de interacción 1:1. Los resultados mostrados en la Figura 2 demuestran los cambios en la densidad óptica debido a la unión del anticuerpo monoclonal a S1P en tres densidades diferentes de S1P. En general, se determinó que la afinidad del anticuerpo monoclonal a S1P era muy elevada, en el intervalo de aproximadamente 88 picomolar (pM) a 99 nM, en función de si se usaba un modelo de unión monovalente o bivalente para analizar la vinculación de datos.

Ejemplo 2: ensayos de ELISA

1. ELISA cuantitativos

Se revistieron placas de ELISA de microtitulación (Costar, N° de cat. 3361) con IgG de conejo anti-ratón, anticuerpo específico del fragmento F(ab')₂ (Jackson, 315-005-047) diluido en Tampón Carbonato 1 M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron con PBS y se bloquearon con PBSBSA/Tween-20 durante 1 hora a 37 °C. Para la incubación primaria se añadieron a los pocillos diluciones de IgG de ratón no específica o de IgG humana, toda la molécula (usada para la curva de calibración) y las muestras a medir. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 ul por pocillo de anti-ratón de cabra conjugado con HRP (H+L) diluido a 1:40.000 (Jackson, N° de cat. 115-035-146) durante 1 hora a 37 °C. Después del lavado, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina (Sigma, N° de cat. T0440) y se detuvo añadiendo H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. Los datos sin procesar se transfirieron a un software GraphPad para el análisis.

2. ELISA Directos

Las placas de ELISA de microtitulación (Costar, N° de Cat 3361) se revistieron con LPA-BSA diluido en Tampón Carbonato 1 M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 hora. 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 PBSBSA/Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Las muestras a analizar se diluyeron a 0,4 ug/ml, 0,2 ug/ml, 0,1 ug/ml, 0,05 ug/ml, 0,0125 ug/ml, y 0 ug/ml y se añadieron 100 ul a cada pocillo. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 ul por pocillo de anti-ratón de cabra conjugado con HRP (dilución a 1:20.000) (Jackson, N° de cat. 115-035-003) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina (Sigma, N° de

cat. T0440) y se detuvo añadiendo H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. Los datos brutos se transfirieron a un software GraphPad para el análisis.

3. Ensayos de competición

5 La especificidad de los mAb se sometió a ensayo en los ensayos de ELISA. Las placas de ELISA de microtitulación (Costar, N° de Cat 3361) se revistieron con LPA-BSA a 18:0 diluido en Tampón de Carbonato 1 M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 hora. 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 PBSBSA/Tween-20 durante 1 hora a 37 °C o durante la noche a temperatura ambiente. Para la incubación primaria, se añadieron a los pocillos de las placas ELISA 0,4 ug/ml de mAb anti-LPA y cantidades designadas de LPA (14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 20:4), DSPA, LPC a 18:1 (lisofosfatidilcolina), S1P, ceramida y ceramida-1-fosfato y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. 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, N° de cat. 115-035-003) o (H+L) anti-humano de cabra conjugado con HRP diluido a 1:50.000 (Jackson, N° de cat. 109-035-003) a 37 °C durante 1 hora. Después del lavado, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina y se detuvo añadiendo H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. Los datos sin procesar se transfirieron a un software GraphPad para el análisis.

Ejemplo 3: mAb SPHINGOMAB murino es altamente específico para S1P

20 Un ELISA competitivo demuestra la especificidad de SPHINGOMAB por la S1P en comparación con otros lípidos bioactivos. SPHINGOMAB no demostró reactividad cruzada con la esfingosina (SPEH), el precursor metabólico inmediato de S1P o de ácido lisofosfatídico (LPA), una importante molécula de señalización extracelular que es estructural y funcionalmente similar a la S1P. SPHINGOMAB no reconoció otros lípidos y metabolitos estructuralmente similares, incluidos ceramida-1-fosfato (C1P), dihidroesfingosina (DH-SPH), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) o esfingomielina (SM). SPHINGOMAB sí produjo reacción cruzada con dihidroesfingosina-1-fosfato (DH-S1P) y, en menor medida, con esfingosilforilcolina (SPC) (Figura 3).

25 Ejemplo 4: SPHINGOMAB Reduce Significativamente la CNV y la Formación de Cicatrices en un Modelo Murino de CNV

Se sometió a ratones C57BL6/J hembra a rotura de la membrana de Bruch inducida por láser y se administraron 0,5 µg de Sphingomab o de un anticuerpo no específico (NS) del mismo isotipo diluido en 2 µl de solución salina fisiológica. Los ratones se sacrificaron 14 y 28 días después de la rotura con láser.

30 Para inducir las lesiones de la CNV se dilataron las pupilas con tropicamida oftálmica (al 0,5 %) y fenilefrina (al 2,5 %). Sobre el ojo se colocó un cubreobjetos. Se usó un Oculight GL a 532 nm (Iridex Corporation, Mountain View, CA) acoplado a una lámpara de hendidura fijada para liberar un pulso de 100 ms a 150 mW con un tamaño de mancha de 50 µm para romper la membrana de Bruch en tres cuadrantes del ojo derecho localizados aproximadamente a 50 µm del disco óptico en las posiciones relativas a las 9, 12 y 3 en punto de un reloj. El ojo izquierdo sirvió como control sin daños en todos los casos. Se excluyó del análisis cualquier lesión no asociada con una burbuja de vapor o las lesiones que se hicieron confluentes.

35 Para medir el tamaño de la lesión de la CNV se prepararon montajes horizontales coroides del complejo esclerótica-coroides-RPE y se tiñeron para ver la vasculatura (aglutinina I de *R. communis*; rojo) y pericitos (CD140b; verde). Se capturaron imágenes digitales usando una cámara digital de alta resolución RGB Spot con epifluorescencia Axioplan 2 de Zeiss y microscopía confocal láser de barrido (BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA). Para los análisis volumétricos se usó una captura de serie z y la sima del área de la lesión a lo largo de la serie z se multiplicó por el espesor z (4 µm) para obtener el volumen de la lesión.

40 Para evaluar el depósito de colágeno, se tiñó el complejo esclerótica-coroides-RPE con Tricromo de Masson. El complejo esclerótica-coroides-RPE se embebió en parafina y a continuación se seccionó en serie a un espesor de 6 micrómetros. Se evaluaron aproximadamente 30 secciones por lesión. La cuantificación del volumen del depósito de colágeno se calculó del mismo modo que se ha descrito para el volumen de la lesión de la CNV.

45 Las imágenes digitales capturadas se evaluaron morfométricamente usando el software ImageJ (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD). La Figura 4A muestra que SPHINGOMAB atenúa espectacularmente la neovascularización corioidea 14 y 28 días después de la rotura de la membrana de Bruch inducida por láser. La Figura 4B muestra que SPHINGOMAB reduce significativamente la fibrosis asociada con la formación de lesiones de la CNV 28 días después de la rotura de la membrana de Bruch inducida por láser.

50 Ejemplo 5: SPHINGOMAB inhibe la neovascularización a través de múltiples mecanismos que incluyen la inhibición de la migración de células endoteliales y la formación de tubos.

55 La S1P estimula la migración de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y, en Matrigel y otros ensayos, la formación de la formación de BV de novo *in vitro*; SPHINGOMAB puede neutralizar estos efectos de la S1P. Se realizaron experimentos tal como se describe en Visentin y col. (Cancer Cell 2006 Mar; 9 (3): 225-38). Los datos de la Figura 5A sugieren que las HUVEC sembradas sobre Matrigel reducido con GF formaban múltiples

estructuras de tipo capilar en presencia de S1P y no formaron estructuras de tipo capilar en ausencia de S1P o cuando se coincubaban con SPHINGOMAB y S1P. Los datos de la Figura 5B demuestran la potente capacidad de S1P 0,1-1 μM para estimular la migración de HUVEC 2-2,5 veces la de las HUVEC sin tratar, o las HUVEC coincubadas con SPHINGOMAB en un ensayo de quimioinvasión en Matrigel. Combinados, estos estudios demuestran que SPHINGOMAB puede atenuar de forma eficaz los efectos proangiogénicos de S1P sobre las CE.

Ejemplo 6: SPHINGOMAB inhibe la neovascularización a través de múltiples mecanismos que incluyen mitigación de los efectos de S1P, VEGF y bFGF *in vivo*

En base a los estudios *in vivo* que muestran que la S1P aumentaba el crecimiento de capilares endoteliales en tapones de Matrigel implantados por vía subcutánea, los inventores han especulado que SPHINGOMAB podría reducir la formación de BV de novo *in vivo*. Para investigar ésto, los inventores han usado el ensayo de Matrigel Plug *in vivo* para determinar la neovascularización. En un conjunto de experimentos, Matrigel se complementó con S1P 1 μM , 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bFGF o 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de VEGF y a continuación se inyectó I.P. en ratones ($n = 4$). Después de 10 días, se heparinizó a los ratones y se les inyectó lectina fluorescente, Isolectina B4-FITC, que se une a las moléculas de adhesión expresadas por las EC vasculares que forman los BV en crecimiento. A continuación, se fragmentaron los tapones, se congelaron en OCT, se seccionaron y se observaron para detectar BV teñidos con FITC. Los datos de la Figura 6A sugieren que S1P es un estimulador más potente de la neovascularización *in vivo* que bFGF o VEGF [Lee, y col., (1999), Biochem Biophys Res Commun., vol 264: 743-50], tal como se pone de manifiesto con la gran cantidad de BV teñidos con FITC en los tapones que contienen S1P en comparación con los tapones que contienen bFGF o VEGF.

A continuación, se tiñeron las secciones de los tapones con hematoxilina y eosina para evaluar la infiltración de EC (Figura 6B). La infiltración de las EC es una etapa crítica en la neovascularización. Los tapones que contenían S1P tenían un aumento de tres veces la infiltración de EC en comparación con los tapones que solo contenían Matrigel. Se supone que la infiltración de células es de CE, aunque los inventores reconocen que también se pueden teñir otros tipos de células, tales como las células inmunes. Los ratones a los que se administra sistémicamente SPHINGOMAB cada 48 horas (iniciado 1 día antes de la implantación de los tapones) mostraron una cantidad reducida de infiltración de EC, incluso cuando se añadió S1P a los tapones de Matrigel. Estos resultados demuestran la capacidad de SPHINGOMAB para inhibir la infiltración de EC *in vivo*.

La S1P endógena de la sangre y del tejido circundante podría proporcionar estímulos proangiogénicos a una herida. Se investigó la capacidad de SPHINGOMAB para reducir la S1P endógena en una herida. Se implantaron tapones estimulados óptimamente (Matrigel complementado con 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bFGF o 10 mg/ml de VEGF) en los ratones. Los ratones recibieron inyecciones i.p. de 25 mg/kg de SPHINGOMAB o solución salina cada 48 horas comenzando el día 1 antes de la implantación de Matrigel. Cada grupo de tratamiento (Matrigel, Matrigel plus GF o Matrigel plus GF y SPHINGOMAB administrado) estaba constituido por un mínimo de 6 ratones. Tras 10 días, se trató a los ratones con heparina, se les inyectó Isolectina B4-FITC, se escindieron los tapones, se incluyeron en medio de congelación OCR y se fragmentaron. Se accedió cualitativamente a la densidad microvascular mediante vasos teñidos con lectinas-FITC como se muestra en la Figura 3C. La tinción de VS fue esporádica en los tapones control (sin tratar), mientras que los tapones que contenían bFGF o VEGF mostraron pruebas significativas de vascularización. Los tapones de los ratones tratados con SPHINGOMAB mostraron una reducción significativa de la formación de VS en comparación con los tapones de bFGF o VEGF de los ratones tratados con solución salina. La cuantificación de los vasos sanguíneos teñidos reveló una disminución de 5 a 8,5 veces la neovascularización de los tapones que contienen VEGF o bFGF, respectivamente, de animales tratados con SPHINGOMAB en comparación con los animales tratados con solución salina (Figura 3C). Esta Evaluación demuestra además la capacidad de la SP1 sérica endógena y tisular para potenciar la microvascularización, así como la capacidad de SPHINGOMAB para neutralizar los efectos proangiogénicos de la S1P endógena.

Ejemplo 7: SPHINGOMAB Inhibe la Formación de Cicatrices *in vivo*

La S1P realiza contribuciones profundas en la cicatrización de heridas a través de la activación de la migración y proliferación de fibroblastos y producción de colágeno; SPHINGOMAB neutraliza estos efectos. En varios estudios que usan múltiples tipos de fibroblastos se confirma la capacidad de la S1P para estimular la curación de heridas: 1) La S1P aumentó la proliferación de fibroblastos Swiss-3T3 medida mediante la incorporación de ^3H -timidina usando procedimientos convencionales (Figura 7A); 2) la S1P estimuló la migración de fibroblastos cardíacos en un ensayo de curación de heridas de raspado convencional. (Figura 7B); 3) la S1P estimuló la expresión de colágeno por los fibroblastos cardíacos aislados de ratones transgénicos que poseían el indicador 1a GFP de colágeno, tal como se indica mediante microscopía inmunofluorescente (Figura 7C); y 4) la S1P indujo la diferenciación de fibroblastos de pulmón WI-38 en miofibroblastos, las células que se activan en la remodelación de cicatrices, tal como se indica mediante el aumento de la expresión de proteína marcadora de miofibroblastos, actina del músculo liso, usando análisis de inmunotransferencia (Figura 7D). En cada uno de estos ensayos, SPHINGOMAB neutralizó las S1P. Se prevé que los fibroblastos oculares podrían responder de un modo similar a la S1P y a SPHINGOMAB. Se han observado similitudes entre la enfermedad cardiovascular y las lesiones neovasculares de la AMD, incluyendo la remodelación de cicatrices y la posterior formación de tejido fibroso de mala adaptación; (Vine, y col. (2005), Ophthalmology., vol 112: 2076-80 y Seddon y Chen (2004), Int Ophthalmol Clin., vol 44: 17-39); por lo tanto, se cree que SPHINGOMAB tendría efectos en la neovascularización ocular y en la formación de cicatrices similares a los que se han demostrado en los sistemas cardiovasculares.

Estudios evaluaron la eficacia de SPHINGOMAB para reducir la formación de cicatrices cardíacas después de un infarto de miocardio (MI) permanente mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda en ratones. La administración sistémica de 25 mg/kg de SPHINGOMAB o solución salina comenzó 48 horas después de la cirugía. Se escogió la administración de anticuerpos a las 48 horas para permitir que se produjera la formación normal de cicatrices reparadoras durante la primera fase del remodelado y para permitir que se produjera una angiogénesis beneficiosa estimulada por S1P inmediatamente después del MI. Dos semanas después del infarto se sacrificó a los ratones y se accedió a la fibrosis mediante tinción del tejido cardíaco con tricromo de Masson. Los animales que reciben tratamientos con SPHINGOMAB presentaron una anulación casi completa de la fibrosis perivascular (Figura 7, fotografías). Como control para cualquier respuesta de curación de heridas no específica, los animales en simulación experimentaron una toracotomía sin ligadura de arterias coronarias.

Ejemplo 8: S1P estimula la transformación de células epiteliales oculares y fibroblastos en miofibroblastos contráctiles que producen tejido cicatricial.

La fibrosis tisular patológica (formación de cicatrices) es un factor contribuyente primario en una serie de trastornos oculares, que incluyen: degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, vitreoretinopatía proliferativa y consecuencias de la cirugía del glaucoma.

En muchos de estos trastornos, los factores de crecimiento y las quimioquinas en circulación estimulan la transformación de células oculares normales en células fibrocontráctiles que producen de tejido cicatricial que se han denominado "miofibroblastos". Normalmente, los miofibroblastos son responsables de la reparación de tejido como parte de la respuesta de curación de heridas después de la lesión. Sin embargo, el número y la función alterados de los miofibroblastos están implicados en enfermedades caracterizadas por formación de tejido cicatricial patológico en el hígado, piel, pulmón, riñón, corazón y ojos. En el ojo, la transformación de las células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE) en una de fenotipo de miofibroblasto está unida a la formación de membranas fibrocontráctiles que producen desprendimiento de retina y posterior alteración de la visión. Además, la transformación en miofibroblastos de los fibroblastos oculares puede dar como resultado la producción de tejido cicatricial anómalo después de una lesión ocular que conduce a la posterior pérdida de visión. Aunque se han identificado muchos de los factores proteicos en circulación en el ojo que estimulan la formación de miofibroblastos, no se sabe nada con respecto al papel de los lisofosfolípidos tales como S1P en este proceso. Por lo tanto, los inventores examinaron los efectos de la S1P sobre la transformación de los miofibroblastos de varias líneas celulares oculares humanas. Tal como se muestra en la Figura 8, la S1P estimula la producción de actina de músculo liso α (α -SMA; un marcador de miofibroblastos) en células epiteliales pigmentarias retinianas humanas (Figura 8A) y fibroblastos de la conjuntiva humana (Figura 8B). Estos datos demuestran por primera vez que la S1P está el medio de los factores químicos circulantes que estimulan la transformación de las células epiteliales oculares y los fibroblastos en miofibroblastos contráctiles que producen de tejido cicatricial que pueden contribuir al desprendimiento de retina, fibrosis ocular y la posterior alteración de la visión.

En estos experimentos, la capacidad de la S1P para estimular la expresión de α -SMA difería de un modo dependiente de la concentración entre las células epiteliales pigmentarias retinianas y los fibroblastos de la conjuntiva. Tal como se muestra, se observó un aumento significativo de la expresión de α -SMA a la concentración de 0,001 μ M en las células epiteliales que disminuyó después hasta los niveles basales a la concentración de 10 μ M. Por el contrario, únicamente se observó un aumento significativo en la expresión de α -SMA a la concentración de 10 μ M en los fibroblastos de la conjuntiva. Se cree que esta diferencia es el resultado de un aumento de la expresión del receptor de S1P en las células epiteliales en comparación con los fibroblastos. Debido al aumento de los niveles de expresión del receptor de S1P, es probable que las células epiteliales pigmentarias retinianas sean más sensibles a la S1P a concentraciones bajas. Por el contrario, a niveles elevados de S1P, los receptores se sensibilizaron, o posiblemente incluso se internalizaron conduciendo a una disminución de la estimulación por S1P.

El colágeno es una de las proteínas estructurales principales que soporta todos los tejidos del organismo y es uno de los componentes principales del tejido cicatricial. En el contexto no patológico, el contenido total de colágeno dentro del tejido se mantiene mediante un equilibrio entre la producción de colágeno por los fibroblastos y la degradación por determinadas enzimas. Una serie de trastornos que implican aumento de los niveles de tejido cicatricial son el resultado, en parte, de procesos fisiológicos y moleculares que inhiben la degradación del colágeno que es necesaria para la formación de cicatrices. Se hizo la hipótesis de que la capacidad de S1P para estimular la formación de tejido cicatricial puede ser el resultado de su capacidad para inhibir la degradación del colágeno, de modo que se producen aumentos netos del tejido cicatricial dentro de los órganos. Por lo tanto, se examinaron los efectos de la S1P en la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) en los fibroblastos de la conjuntiva humana. El aumento de la expresión de PAI-1 se correlaciona con una disminución de la degradación proteolítica de tejido conjuntivo y se regula de forma positiva en asociación con varias enfermedades fibróticas que implican un aumento de la cicatrización. Tal como se muestra en la Figura 8C, la S1P estimula la expresión de PAI-1 de un modo dependiente de la dosis. Estos datos sugieren que también puede estimular la formación de tejido cicatricial estimulando la expresión de proteínas que inhiben su degradación, lo que sugiere que la S1P funciona a través de múltiples vías mecánicas para estimular y mantener la cicatrización patológica asociada con las enfermedades oculares.

Ejemplo 9: SPHINCOMAB inhibe la infiltración de células inflamatorias e inmunes

La inflamación es la primera respuesta en el proceso de remodelación. Se desencadena tanto por isquemia como por

daños celulares y da como resultado la regulación positiva de la expresión de citoquinas que estimula la migración de macrófagos y neutrófilos al área dañada para la fagocitosis de las células muertas y para regular de forma positiva también la respuesta inflamatoria [Jordan, *y col.* (1999), *Cardiovasc Res.*, vol 43: 860-78]. Los mastocitos también son mediadores celulares importantes de la respuesta inflamatoria. La S1P liberada por los mastocitos es responsable de muchas de las respuestas adversas observadas en modelos animales experimentales de inflamación [Jolly, *y col.* (2004), *J Exp Med.*, vol 199: 959-70 y Jolly *y col.* (2005), *Blood.*, vol 105: 4736-42].

En base a las similitudes de las respuestas inmunitarias e inflamatorias en la CNV y la CVD, se evaluó la eficacia de SPHINGOMAB para atenuar la infiltración de células inmunitarias en una herida en un modelo de infarto murino como indicación de los posibles efectos de SPHINGOMAB en la atenuación de estos daños durante la AMD [Vine, *y col.* (2005), *Ophthalmology.*, vol 112: 2076-80; y Seddon y Chen (2004), *Int Ophthalmol Clin.*, vol 44: 17-39]. Cuatro días después del MI, se evaluó la infiltración de macrófagos y mastocitos usando los anticuerpos MAC-1 y MCG35, respectivamente, dentro del área en riesgo. SPHINGOMAB atenuó de forma espectacular la densidad de los macrófagos inflamatorios (Figura 9A) y los mastocitos (Figura 9B), lo que sugiere que SPHINGOMAB puede neutralizar los daños inmunitarios e inflamatorios durante la AMD.

15 **Ejemplo 10: Clonación y Caracterización de los dominios variables de un anticuerpo monoclonal murino de S1P (LT1002; Sphincomab)**

Este ejemplo informa de la clonación del mAb murino frente a S1P. La estrategia global consistía en la clonación de los dominios variables de murino tanto de la cadena ligera (VL) como de la cadena pesada (VH). La secuencia consenso de 306D de VH muestra que el fragmento de la región constante es coherente con un isótopo gamma 2b. Los dominios variables de murino 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 un constructo de anticuerpo quimérico.

1. Clonación del mAb murino

Se cultivó un clon de la línea celular 306D326.1 del hibridoma anti-S1P (Nº de la ATCC SD-5362) en DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco con GlutaMAX™ I, 4500 mg/l de D-Glucosa, Piruvato Sódico; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, 111-035-003), FBS al 10 % (Clon Fetal Estéril I, Perbio Science), y 1X de glutamina/Penicilina/Estreptomycin (Gibco/Invitrogen). El ARN total se aisló de 10⁷ células de hibridoma usando un procedimiento basado en el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden Alemania). El ARN se usó para generar una primera hebra de ADNc siguiendo el protocolo del fabricante (1^{er} kit para síntesis de hebras, Amersham Biosciences).

El ADNc de la región variable de cadena pesada (VH) de la inmunoglobulina se amplificó por PCR usando un cebador MHV7 (MHV7: 5'-ATGGRATGGAGCKGGRCTTTMTCTT-3' [SEC ID Nº: 1]) en combinación con una mezcla de cebador MHCG1/2a/2b/3 de región constante de IgG2b (MHCG1: 5'-CAGTGGATAGACAGATGGGGG-3' [SEC ID Nº: 2]; MHCG2a: 5'-CAGTGGATAGACCGATGGGGC-3' [SEC ID Nº: 3]; MHCG2b: 5'-CAGTGGATAGACTGATGGGGG-3' [SEC ID Nº: 4]; MHCG3: 5'-CAAGGGATAGACAGATGGGGC-3' [SEC ID Nº: 5]). El producto de la reacción se unió en el vector pCR2.1[®]-TOPO[®] (Invitrogen) usando el kit y la secuencia de clonación de TOPO-TA[®]. A continuación, se amplificó el dominio variable de la cadena pesada por PCR a partir de este vector y se insertó como un fragmento Hind III y Apa I y se unió en el vector de expresión pG1D200 (véase la patente de Estados Unidos Nº 7.060.808) o pG4D200 (id.) que contenía al promotor HCMV, una secuencia de dirección, y la región constante gamma-1 para generar el plásmido pG1D200306DVH (Figura 10). La secuencia consenso de 306D de V_H (que se muestra a continuación) mostró que el fragmento de la región constante era coherente con un isotipo gamma 2b.

De forma análoga, la región variante de la cadena kappa de inmunoglobulina (VK) se amplificó usando el cebador MKV 20 (5'-GTCTCTGATTCTAGGGCA-3' [SEC ID Nº: 6]) en combinación con el cebador de la región constante kappa MKC (5'-ACTGATGGTGGGAAGATGG-3' [SEC ID Nº: 7]). El producto de esta reacción se unió en el vector pCR2.1[®]-TOPO[®] usando el kit y la secuencia de clonación TOPO-TA[®]. A continuación, el dominio variable de la cadena ligera se amplificó por PCR y a continuación se insertó como un fragmento Bam HI y Hind III en el vector de expresión pKN100 (véase la patente de Estados Unidos Nº 7.060.808) que contenía al promotor HCMV, una secuencia de dirección, y el dominio constante de kappa humano, que genera el plásmido pKN100306DVK.

Los plásmidos de la cadena pesada y ligera pG1D200306DVH más pKN100306DVK se transformaron en bacterias DH4a y se almacenaron en glicerol. Se preparó ADN de plásmido a gran escala tal como lo describe el fabricante (Qiagen, kit MAXIPREP™ sin endotoxinas). Se secuenciaron muestras de ADN, purificadas usando el Kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen o el Kit EndoFree Plasmid Mega/Maxi, usando un secuenciador automático ABI 3730x1, que también traduce las señales fluorescentes en sus correspondientes secuencias de nucleobases. Se diseñaron cebadores en los extremos 5' y 3' de modo que se pudo solapar la secuencia obtenida. La longitud de los cebadores era de 18-24 bases, y contenían preferentemente un contenido de GC al 50 % y no se predecían dímeros ni estructura secundaria. Las secuencias de aminoácidos para los dominios V_H y V_L de ratón a partir de Sphingomab™ son las SEC ID Nºs: 8 y 9, respectivamente (Tabla 2). Los restos de CDR (véase Kabat, EA (1982), *Pharmacol Rev.*, vol. 34: 23-38) se subrayan en la Tabla 2, y se muestran por separado a continuación en la Tabla 3.

Tabla 2: dominios V_H y V_L a partir de mAb de murino, SpHINGOMAB™

dominios V_H de ratón QAHLQQSDAELVKPGASVKISCKVSGFIFIDHTIHWKQRPEQG **SEC ID N°: 8**
 LEWIGCISPRHDITKYNEMFRGKATLTADKSSTTAYIQVNSLTF
 EDSAVYFCARGGFYGSTIWfDFWGQGTTLTVS

dominios V_L de ratón ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITTTDIDDDMNWFQOKPGEPPNLLISE **SEC ID N°: 9**
 GNILRPGVPSRFSSSGYGTDLFLFTIENMLSEDVADYYCLQSDNLPFTFGS
 GTKLEIK

Tabla 3: Secuencias de CDR SpHINGOMAB™ de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón

V _L CDR	CDR
ITTTDIDDDMN (SEC ID N°: 10)	CDR1
EGNILRP (SEC ID N°: 11)	CDR2
LQSDNLPFT (SEC ID N°: 12)	CDR3
V _L CDR	CDR
V _H CDR	
DHTIH (SEC ID N°: 13)	CDR1
CISPRHDITKYNEMFRG (SEC ID N°: 14)	CDR2
GGFYGSTIWfdf (SEC ID N°: 15)	CDR3

- 5 Las secuencias de aminoácidos de varios dominios variables de anticuerpo quimérico (V_H y V_L) se comparan en la Tabla 4. Estas variantes se clonaron en los vectores de expresión Lonza. Las secuencias de los dominios V_H y V_L de murino se usaron para construir un modelo molecular para determinar que restos de la región marco se deberían incorporar en el anticuerpo humanizado.

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de los dominios V_H y V_L humanizados a partir de las variantes de anticuerpo anti-S1P humanizado

Variantes de V _H	
pATH200 SEC ID N°: 16	mgstailallavlgvcsevqlvqsgaevkpkgeskiscqsfgyifidhtihwvrqmpggglewmgcisprhdi tkyn
pATH201m.....
pATH202f.....m.....i.....
pATH203i.....
pATH204f.....
pATH205f.....m.....i.....
pATH206a.....f.....m.....i.....
pATH207m.....a.....
Continuación de Secuencias:	
pATH200 Continuación	emfrgqvtisadkssstaylqwsslkasdtamyfcarggygstiwdfwgggtmvtvssastkgps
pATH201
pATH202
pATH203
pATH204
pATH205a.l.....
pATH206a.l.....
pATH207

Tabla 4 continuación	
Variantes de VI.	
pATH300 (SEC ID Nº: 17)	mdmrvpagllgllllwlpgarcttltqspstltsasvdrvrtitctttddidmnyqqepgkpklliyegnilrpgv
pATH301s.....
pATH302f.....
pATH303v.....s.....
pATH304f.....s.....
pATH305v.....f.....s.....
pATH306v.....f.....s.....
pATH308v.....f.....s.....
pATH309s.....
Continuación de Secuencias:	
pATH300 Continuación	psrfsgsgtdftltisklpedfatyyclgsdnlpftfgqgkkleikrewip
pATH301
pATH302
pATH303-
pATH304
pATH305
pATH306s.....
pATH308s..y.....
pATH309s..y.....

Las secuencias de nucleótidos correspondientes se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5: secuencias de pATH y CDR

Nombre	Secuencia	SEC ID Nº:
CDR1 V _L :	ataaccaccactgatattgatgatgatgaac	18
CDR2 V _L :	gaaggcaatattctcgtcct	19
CDR3 V _L :	ttgcagagtgataactaccattcacg	20
CDR1 V _H	gaccatactcac	21
CDR2 V _H :	tstatttctccasacateataattactaaatacaateasateltcaeeegc	22
CDR3 V _H :	ggggggttctacggtagtactatctggttgacttt	23
CDR2 V _H (pATH 207):	gctatttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttcaggggc	24
pATH200 secuencia de nucleótidos:	<u>cgccaagcttgccgccaccatgggggtcaaccgccatcctcgccctcctcctg</u> <u>gctgttctccaaggagtctgttccgaggtgcagctgggtgcagtctggagcag</u> aggtgaaaaagcccggggagtctctgaagatctcctgtcagagtttggatac atctttatcgaccatacttcaactgggtgcgccagatgccgggcaaggcctg gagtggtgatgtatttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttca ggggccaggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgc agtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtatttctgtgcgagag gggggttctacggtagtactatctggtttgactttggggccaagggacaatg gtcaccgtctctcagcctccaccaagggccatcg	25
pATH207 secuencia de nucleótidos:	<u>cgccaagcttgccgccaccatgggggtcaaccgccatcctcgccctcctcctg</u> <u>gctgttctccaaggagtctgttccgaggtgcagctgggtgcagtctggagcag</u> aggtgaaaaagcccggggagtctctgaagatctcctgtcagagtttggatac atcgaccatacttcaactggatgcgccagatgccgggcaaggcctggagtg gatgggggtctatttctcccagacatgatattactaaatacaatgagatgttcag ggggccaggtcaccatctcagccgacaagtccagcagcaccgcctacttgc gtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtatttctgtgcgagagg gggggttctacggtagtactatctggtttgactttggggccaagggacaatggt caccgtctctcagcctccaccaagggccatcg	26
pATH207 secuencia de aminoácidos	mgstailallavlqgvcevqlvqsgaevkkpgeslkiscqsfgyifidhti hwmrmpgqglewmgaisprhditkynemfrgqvtsadkssstaylq wsslkasdtamyfcarggyfystiwfdfwgqgmvvtvssastkgps	27
pATH300 secuencia de nucleótidos:	<u>cgccaagcttgccgccaccatggacatgagggtccccgctcagctcctggg</u> <u>gctcctgctgcttggctcccagggtgccagatgtgaaacgacactcacgcag</u> tctccatccttctgtctgcatctgtagggagacagagtcaccatcacataacca ccactgatattgatgatgatatgaactggtatcagcaggaaccagggaaagc ccctaagctcctgatctatgaaggcaatattctcgtcctgggggtccatcaag gttcagcggcagtggtatctggcacagatttcaactcaccatcagcaaattgc agcctgaagatttgaacttattactgtttgcagagtataactaccattcacg ttcggccaagggaccaagctggagatcaaactgagtgatcccgcg	28

(continuación)

Nombre	Secuencia	SEC ID N°:
pATH308 secuencia de nucleótidos:	cgccaagcttgccgccaccatggacatgaggggtccccgctcagctcctggg gctcctgctgctctggctcccaggggcccagatgtgaaacgacagtgacgca gtctccatccttctgtctgcatctgtagggagacagagtcaccatcacttgcaia accaccactgatattgatgatgatgaactgggtccagcaggaaccagggga aagcccctaagctcctgatctccgaaggcaatattctctgctggggtccat caagattcagcagcagtgatggcacagattcactctcaccatcagcaaa ttgcagcctgaagatttgcacttattactgtttcagagtgataacttaccatt cacttcggccaagggaccaagctggagatcaaac	29
pATH308 secuencia de aminoácidos	mrvpaqllgllllwlpgarctvtqpsfslsasvgrvritcittddidmnn wfpqpgkapkllisegnilrpgvpsrfsstssgygtdftlisklqpedfatyycl qsdnlpftfgqgkileik	30

2. Expresión y propiedades de unión del anticuerpo quimérico.

5 Los plásmidos de cadena pesada y ligera tanto de pG1D200306DVH como de pKN100306DVK se transformaron en bacterias DH4a y se almacenaron en glicerol. Se preparó ADN de plásmido a gran escala tal como lo describe el fabricante (Qiagen, kit MAXIPREP™ sin endotoxinas, N° de Cat. 12362).

10 Para la expresión de anticuerpo en un sistema de mamífero no humano, los plásmidos se transfectaron en la línea celular de riñón de mono verde africano de fibroblastos COS 7 por electroporación (0,7 ml al 10^7 células/ml) usando 10 ug de cada plásmido. Las células transfectadas se sembraron en placas en 8 ml de medio de crecimiento durante 4 días. El anticuerpo quimérico 306DH1 x 306DVK-2 se expresó en 1,5 µg/ml en medio de acondicionado de células COS cotransfectado de forma transitoria. La unión de este anticuerpo a S1P se midió usando el ELISA para S1P.

15 El nivel de expresión del anticuerpo quimérico se determinó en un ELISA cuantitativo tal como sigue a continuación. Las placas de microtitulación (inmunoplaaca Nunc MaxiSorp, Invitrogen) se revistieron con alícuotas de 100 µl de 0,4 µg/ml de anticuerpo IgG anti-humano de cabra (Sigma, St. Louis, MO) diluido en PBS y se incubó durante la noche a 4 °C. A continuación, las placas se lavaron tres veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado (1 x PBS, Tween al 0,1 %). Se transfirieron alícuotas de 200 µl de cada muestra de suero o sobrenadante de fusión diluidos a las placas revestidas con toxina y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después de 6 lavados con tampón de lavado, el conjugado de peroxidasa de cadena ligera kappa de cabra anti-humano (Jackson Immuno Research) se añadió a cada pocillo a una dilución 1:5000. La reacción se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron 6 veces con el tampón de lavado, y se añadieron 150 µl del sustrato K-BLUE (Sigma) a cada pocillo, se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de solución de RED STOP (SkyBio Ltd.) y la absorción se determinó a 655 nm usando un Lector de Microplacas 3550 (Bio-Rad Laboratories Ltd.). Los resultados de los ensayos de unión a anticuerpo se muestran en la Figura 11.

3. Expresión de 293F

25 Los plásmidos de cadenas pesadas y ligeras se transformaron en Top 10 de *E. coli* (células de *E. coli* químicamente competentes en One Shot Top 10 (Invitrogen, C4040-10)) y se almacenan en glicerol. Se preparó ADN de plásmido a gran escala tal como lo describe el fabricante (Qiagen, kit de MAXIPREP™ sin endotoxinas N° de Cat 12362).

30 Para la expresión de anticuerpos en un sistema humano, los plásmidos se transfectaron en la línea celular de riñón embrionario humano 293F (Invitrogen) usando 293fectina (Invitrogen) y usando Medios 293F-FreeStyle (Invitrogen) para cultivo. Los plásmidos de cadena ligera y pesada se transfectaron a 0,5 g/ml. Las transfecciones se realizaron a una densidad celular de 10^6 células/ml. Los sobrenadantes se recogieron por centrifugación a 1100 rpm durante 5 minutos a 25 °C, 3 días después de la transfección. Los niveles de expresión se cuantificaron por ELISA cuantitativo (véanse los ejemplos anteriores) y variaron de -0,25 a 0,5 g/ml para el anticuerpo quimérico.

4. Purificación del anticuerpo

35 Los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo mediante el paso sobrenadantes de cultivo sobre columnas de proteína A/G (Pierce, N° de Cat. 53133) a 0,5 ml/min. Las fases móviles consistían en Tampón de unión de IgG IX Pierce (N° de Cat. 21001) y glicina 0,1 M a pH 2,7 (Pierce, Tampón de Elución, N° de Cat. 21004). Se diluyeron colecciones de anticuerpos en glicina 0,1 M al 10 % (v/v) con Tampón Fosfato 1 M, pH 8,0, para neutralizar el pH. Las colecciones de IgG1 se combinaron y se dializado en exhaustivamente frente a IX PBS (Casete

Pierce Slide-A-Lyzer, 3500 MWCO, N° de Cat. 66382). Los eluatos se concentraron usando Centricon YM-3 (10.000 MWCO Amicon N° de Cat. 4203) por centrifugación durante 1 hora a 2.500 rcf. La concentración de anticuerpo se determinó por ELISA cuantitativo tal como se ha descrito anteriormente usando una solución de reserva de IgG1 de mieloma como patrón. Los isotipos de cadena pesada de los mAb se determinó por ELISA usando un Kit para Formación de Isotipos de Anticuerpo Monoclonal (Sigma, ISO-2).

5. Unión comparativa de variantes de anticuerpos a S1P

La Tabla 6, a continuación, muestra un análisis comparativo de mutantes con el anticuerpo quimérico. Para generar estos resultados, se detectó el anticuerpo unido mediante un segundo anticuerpo, específico para la IgG de ratón o humana, conjugado con HRP. La reacción cromogénica se midió y se indicó como densidad óptica (DO). La concentración del panel de anticuerpos fue de 0,1 ug/ml. No se detectó interacción del segundo anticuerpo con la matriz revestida con S1P sola.

Tabla 6 : Unión comparativa a S1P en variantes del anticuerpo anti-S1P quimérico.

Dominio Variable	Mutación	Plásmidos	Unión
HC	Quimérico	pATH50 + pATH10	1,5
	CysAla	pATH50 + pATH11	2
	CysSer	pATH50 + pATH 12	0,6
	CysArg	pATH50 + pATH 14	0,4
	CysPhe	pATH50 + pATH16	2
LC	MetLeu	pATH53 + pATH10	1,6

6. Determinación de la Cinética de Unión por Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

Todos los datos de unión se recogieron en un biosensor óptico Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala Suecia). S1P se acopló a un chip sensor CM5 de maleimida. En primer lugar, el chip CM5 se activó con una mezcla igual de NHS/EDC durante siete minutos seguido por una etapa de bloqueo de 7 minutos con etildiamina. A continuación, se pasó sulfo-MBS (Pierce Co.) sobre las superficies a una concentración de 0,5 mM en tampón de ejecución de HBS (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, P20 al 0,005%, pH 7,4). S1P se diluyó en el tampón de ejecución de HBS a una concentración de 0,1 mM y se inyectó durante periodos de tiempo diferentes produciendo 2 superficies de S1P de densidades diferentes (305 y 470 RU). A continuación, los datos de unión para el mAb se recogieron usando unas diluciones en serie con factor de dilución 3 a partir de 16,7 nM, 50,0 nM, 50,0 nM, 16,7 nM y 16,7 nM para el ratón, y anticuerpos 201308, 201309, 207308, respectivamente.

Cada concentración se sometió a ensayo por duplicado. Las superficies se volvieron a generar con NaOH 50 mM. Todos los datos se recogieron a 25 °C. Se procesaron de los datos de las respuestas usando una superficie de referencia, así como inyecciones en blanco. Los conjuntos de datos (las respuestas de dos superficies y cada variante sometida a ensayo dos veces se ajustaron a modelos de interacción para obtener parámetros de unión. Los datos de las diferentes concentraciones de mAb se ajustaron globalmente usando un modelo de interacción a 1:1 (ratón) o 1:2 (variantes) para determinar las constantes de velocidad de unión aparente. El número entre paréntesis indica el error en el último dígito.

Ejemplo 11: mAb quimérico para S1P

Tal como se usa en el presente documento, el término anticuerpo "quimérico" (o "inmunoglobulina") se refiere a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera que es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies correspondientes o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Cabilly, y col, mencionado anteriormente; Morrison y col, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851 (1984)).

Se generó anticuerpo quimérico para S1P usando las regiones variables (Fv) que contienen las regiones de unión a S1P activas del anticuerpo murino a partir de un hibridoma en particular (número de almacenamiento de depósito de seguridad de la ATCC SD-5362) con las regiones Fc de una inmunoglobulina IgG1 humana. Las regiones Fc contenían los dominios CL, ChL, y Ch3 del anticuerpo humano. Sin quedar limitado a un procedimiento en particular, los anticuerpos quiméricos también se podrían haber generado a partir de las regiones Fc de las IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, o IgM humanas. Tal como observarán los expertos en la materia, los anticuerpos "humanizados" se pueden generar por injerto de regiones que determinan de la complementariedad (CDR, por ejemplo CDR1-4) del mAb anti-S1P murino con regiones marco conservadas de anticuerpo humano (por ejemplo, Frl, Fr4, etc.), tales como las regiones marco conservadas de una IgG1. La Figura 11 muestra la unión de los mAb quiméricos y murinos completos

en una medición directa de ELISA usando S1P tiolada como material de partida.

Para los experimentos de ELISA directo mostrados en la Figura 11, el anticuerpo quimérico para S1P presentaba características de unión similares a las del anticuerpo monoclonal totalmente murino. Se realizaron ELISA en placas para ELISA de unión elevada de 96 pocillos (Costar) revestidas con 0,1 µg de S1P tiolada, sintetizada químicamente, conjugada con BSA en tampón de unión (Na₂CO₃ 33,6 mM, NaHCO₃ 100 mM; pH 9,5). La S1P tiolada-BSA se incubó a 37 °C durante 1 h o a 4 °C durante una noche en la placa para ELISA. A continuación, las placas 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 µl de la muestra (que contenía la S1P a medir), con 25 µl de 0,1 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-S1P diluido en PBST y se añadió a un pocillo de la placa para ELISA.

Cada muestra se realizó en pocillos por triplicado. Después de a 1 h de incubación a temperatura ambiente, las placas para ELISA se lavaron cuatro veces con PBS y se incubó con 100 µl por pocillo de 0,1 µg/ml de HRP secundario de cabra anti-ratón (Jackson Immunoresearch) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron cuatro veces con PBS y se expusieron a tetrametilbencidina (Sigma) durante 1-10 minutos. La reacción de detección se detuvo mediante la adición de un volumen igual de H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica de las muestra se determinó midiendo a 450nm usando un lector de placas de ELISA EL-X-800 (Bio-Tech).

De nuevo, el procedimiento preferente para medir cualquier tipo de anticuerpo en el suero de un animal inmunizado o en medios acondicionados con células (por ejemplo, sobrenadante) de una célula que produce anticuerpos tales como un hibridoma, implica el revestimiento de la placa de ELISA con un ligando diana (por ejemplo, un análogo tiolado de S1P, LPA, etc.) que se ha unido covalentemente a un vehículo de proteína tal como BSA.

Sin estar limitado a ningún procedimiento o ejemplo en particular, se podrían generar anticuerpos quiméricos frente a otras dianas lipídicas tales como LPA, PAF, ceramidas, sulfatidas, cerebrósidos, cardiolipinas, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, ácidos fosfatídicos, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, eicosinoides, y otros leucotrienos, etc. Además, muchos de estos lípidos también se podrían glicosilar y/o acetilar, si se desea.

Ejemplo 12: Generación y caracterización de anticuerpo monoclonal anti-S1P humanizado LT1009 (Sonepcizumab)

Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal anti-S1P murino 306D (LT1002; Sphingomab™), que se une específicamente a S1P, suprime potentemente la angiogénesis y el crecimiento tumoral en diversos modelos animales. Tal como se analiza a continuación, se humanizó LT1002 usando búsquedas de identidad de secuencias y homología para marcos conservados humanos en los que injertar las CDR murinas y un modelo generado por ordenador para guiar algunas retromutaciones de marco conservado. Dos variantes, HuMAbHCLC₃ (LT1004) (con 3 retromutaciones en la cadena ligera) y HuMAbHCLC₅ (LT1006) (con 5 retromutaciones en la cadena ligera) presentaron afinidad de unión en el intervalo nanomolar. Además se realizó ingeniería en un esfuerzo para mejorar las propiedades biofísicas y biológicas de las variantes humanizadas. Las variantes humanizadas HuMAbHC_{CysAla}LC₃ (LT1007) y HuMAbHC_{CysAla}LC₅ (L1009) en las que un resto sin cisteína en HCDR2 se sustituyó con alanina presentaron una afinidad de unión en el intervalo picomolar. Todas las variantes humanizadas inhibieron la angiogénesis en el modelo de neovascularización coroidea (CNV) de degeneración macular relacionada con la edad (AMD), con HuMAbHC_{CysAla}LC₅ (LT1009) presentando una estabilidad y una eficacia *in vivo* superiores en comparación con el anticuerpo murino precursor. La variante huMAbHC_{CysAla}LC₅ (LT1009) se denominó Sonepcizumab™.

a. Diseño de humanización para el anticuerpo anti-S 1 P

Los dominios variables de variable mAb murino LT1002 (Sphingomab™) se humanizaron a través de injerto de CDR (Patente de Estados Unidos de Winter N° 5.225.539). Los restos de CDR se identificaron en base a la hipervariabilidad de la secuencia tal como se describe en Kabat y *col.* 1991.

En este estudio, las estructurasceptoras adecuadas se seleccionaron en base a una búsqueda de homología de anticuerpos humanos en las bases de datos de IMGT y Kabat usando un programa de alineamiento estructural (SR v7.6). La etapa inicial fue consultar estas bases de datos de secuencia humana variable pesada (VH) y variable ligera (VL) con las secuencias de proteínas LT1002 de VH y VL, respectivamente, para identificar las regiones marco conservadas humanas (FR) con alta identidad de secuencia en la FR, en Vernier (Foote, J. y Winter, G. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol. Biol.* 224, 487-499 (1992)), Canonical (Morea, y *col.*, Antibody modeling: implications for engineering and design, *Methods* 20, 267-279 (2000) y restos de superficie de contacto de VH-VL (Chotia, C., Novotny, J., Brucoleri, R., y Karplus, M. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol. Biol.* 186, 651-663 (1985)) y con las CDR de clase y/o longitud canónica idéntica. La identidad de cada miembro de esta biblioteca con restos alineados individuales del anticuerpo de ratón se calculó usando el programa. Se identificaron las secuencias humanas con la secuencia de FR más idéntica con la FR de ratón, produciendo una lista inicial de secuencias humanas "aceptores". Además, se calcularon esas secuencias con la mayor identidad con el anticuerpo de ratón, en Vernier, restos Canónicos y de Superficie de Contacto de VH-VL (VCI). Las diferencias en estas posiciones entre humano y de ratón se clasificaron en sustituciones conservativas y no conservativas, de modo que la mejor elección de marco conservado tendría el menor número de diferencias VCI no conservar que la de LT1002. Los bucles L3 y H1 de la CDR de LT1002 se podrían

clasificar en estructuras canónicas. Estas estructuras L3 y H1 se usan para seleccionar las FR de anticuerpo humano con estructuras canónicas idénticas. Para las CDR sin clasificar, se hizo un intento para seleccionar los marcos conservados humanos con longitudes de CDR idénticas al anticuerpo de ratón. La razón es que las estructuras en bucle de CDR dependen no solamente de la secuencia de bucle de la CDR en sí, sino también de los restos del marco conservado subyacente (restos canónicos). Por lo tanto, es probable que un marco conservado humano con las estructuras de la CDR y/o longitudes de la CDR canónicas emparejadas mantenga las CDR de ratón injertadas en la orientación más adecuada para mantener la afinidad de unión al antígeno. Esto se consiguió para todas las CDR, excepto para la H3 de CDR, por la elección de las secuencias humanas de marco conservado. Además, cuando fue posible se excluyeron los marcos conservados con restos inusuales de cisteína o prolina. Estos cálculos se realizaron por separado para las secuencias de cadena pesada y ligera. Por último, se compararon las diferencias individuales en la secuencia, en toda la región marco conservada, en las secuencias del mejor emparejamiento. De los anticuerpos humanos que mejor se ajustan a los cálculos comparativos anteriores, se seleccionaron los anticuerpos AY050707 y AJ002773 como el proveedor de marco conservado humano de más adecuado para la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente.

La segunda etapa fue generar un modelo molecular de las regiones variables de LT 1002 e identificar los restos de FR que podrían afectar a la unión al antígeno, pero no se incluyeron en el grupo de restos de Vernier, Canónicos y de Superficie de Contacto. Muchas de las características estructurales de los dominios variables de los dadores y aceptores de injerto se examinaron con el fin de comprender mejor cómo diversos restos de FR influyen en la conformación de los bucles de CDR y viceversa. Los restos de FR no conservados en LT1002 que probablemente impactará en las CDR se identificaron a partir de las definiciones de Vernier y Canónicas (véase anteriormente) y por lo tanto diversos restos de la FR humana se restauraron a los aminoácidos murinos originales (retromutados).

b. Mutagénesis

Se crearon mutaciones dentro de las secuencias del dominio variable usando el Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange (Stratagene, N° de Catálogo 200524). Se realizaron reacciones individuales con 50 ng de molde de ADN bicatenario, 2,5 U de PfuUtre HF de ADN polimerasa y su tampón correspondiente (Stratagene, N° de Catálogo 200524), mezcla de dNTP 10 mM y 125 ng de cada uno de los oligonucleótidos mutagénicos resuspendidos en Tris-HCl 5 mM (pH 8,0), y EDTA 0,1 mM. La desnaturalización inicial se realizó a 95 °C durante 30 s, seguido de 16 ciclos de amplificación: 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 60 s y 68 °C durante 8 min. Después del ciclo de temperatura, la reacción final se digirió a continuación con digestión de DpnI a 37 °C durante 1 h para retirar el ADN precursor metilado. El mutante resultante se transformó en *E. coli* XL1-Blue competente y se sembró en LB-agar que contenía 50 µg/ml de Ampicilina. A continuación, las colonias se comprobaron por secuenciación. Cada uno de los mutantes se cultivó a continuación en matraces de agitación de 1 litro y se purificaron usando el Kit de Purificación de Plásmidos EndoFree de Qiagen, N° de catálogo 12362.

c. Generación de las variantes de anticuerpo humanizado

Se construyó un anticuerpo quimérico de ratón-humano (chMAb S1P) por clonación de los dominios variables de LT1002 en un vector que contenían las regiones constantes humanas de las cadenas kappa y pesada para permitir la expresión del anticuerpo de longitud total en células de mamífero. La generación de la cadena pesada humanizada fue el resultado de injerto de las CDR de Kabat 1, 2 y 3 a partir de LT1002 V_H en el marco conservado aceptor de AJ002773. El gen de la línea germinal más cercano a AJ002773 era VH5-51, cuya secuencia de dirección se incorporó, como una secuencia de dirección, en la variante de la cadena pesada humanizada. La secuencia de proteínas de pATH200, la primera versión humanizadas de LT1002 V_H, con la secuencia de dirección VH5-51, se muestra en la Tabla 4. En el caso del dominio V_H de LT1002, los restos en la posición 2, 27, 37, 48, 67 y 69 eran restos de Vernier o en la superficie de contacto de los dominios V_H y V_L y probablemente influye en la orientación de la CDR. La posición 37 parecía ser crítica para la superficie de contacto entre los dominios V_H y V_L. los restos en estas posiciones en el marco conservado humano se retromutaron con el resto murino encontrado en la posición correspondiente. Las mutaciones, V37M, M48I e Y27F, se sometieron a ensayo individualmente. Una versión (pATH205) contenía las 3 mutaciones junto con V67A más 169L y otra versión (pATH206) contenían las 5 mutaciones más V2A.

La generación de la cadena ligera humanizadas fue el resultado de injerto detrás CDR de Kabat 1, 2 y 3 a partir de LT1002 V_L en el marco conservado aceptor de AY050707. El gen de la línea germinal más cercano a AY050707 era L11, cuya secuencia de dirección se incorporó en el constructo humanizado de cadena ligera. La proteína y las secuencias de ADN de pATH300 (cadena ligera de LT1002) son SEC ID N°: 17 y 28, respectivamente (véase la Tabla 4 para las secuencias de aminoácidos). En el caso de V_L, se seleccionaron cuatro posiciones de Vernier no conservadoras 4, 36, 49, 64 para retromutación a restos de murino ya que están implicadas en el apoyo de la estructura de los bucles de la CDR. La inspección del modelo molecular de LT1002 sugiere que Tyr 67 está próximo a la superficie de la CDR y se orienta hacia el plano de unión del antígeno y podría interactuar con la S1P. por lo tanto, la retromutación de S67Y también se añadió a versiones humanizadas posteriores. Se introdujeron dos mutaciones por separado para generar dos versiones que contenían Y49S o Y36F. se crearon varias versiones con las siguientes combinaciones de mutaciones: (Y49S, F4V), (Y49S, Y36F), (Y49S, Y36F, F4V), (Y49S, G64S), (Y49S, Y36F, F4V, G64S), (Y49S, Y36F, F4V, G64S, S67Y), (Y49S, G64S, S67Y).

d. Selección de los candidatos directores humanizados

Las regiones variables de las versiones injertadas básicas (pATH 200 y pATH 300) y todas las variantes que contienen retromutaciones se clonaron en vectores de expresión que contienen las regiones constantes V_H o V_L humanas. Todas las variantes humanizadas se produjeron de mamífero en las mismas condiciones que el anticuerpo quimérico (chMAb) y se sometieron al ensayo para la unión a S1P por ELISA. El rendimiento fue de aproximadamente 10-20 mg/l para las variantes humanizadas y 0,3-0,5 mg/l para chMAb S1P. SDS-PAGE en condiciones reductoras reveló dos bandas a 25 kDa y 50 kDa con alta pureza (> 98 %), coherentes con las masas esperadas de las cadenas pesada y ligera. Se observó una sola banda en condiciones no reductoras con la masa esperada de ~ 150k. Se usó chMAb como un patrón en los ensayos de unión anticuerpos humanizados porque contenía las mismas regiones variables que el anticuerpo de ratón precursor y llevaban las mismas regiones constantes que los anticuerpos humanizados y por lo tanto se podrían detectar usando el mismo protocolo de ELISA.

El anticuerpo humanizado inicial, en el que se injertaron seis CDR de murino en marcos conservados humanos sin mutar, no presentaron ninguna unión detectable a S1P (Figura 11). La cadena ligera kappa que contiene las 4 retromutaciones (Y49S, Y36F, F4V y G64S), en asociación con la cadena pesada quimérica, presentaron una unión subóptima a S1P tal como se mide con ELISA. La incorporación de una mutación adicional en la posición Y67 mejoró significativamente la unión. La versión pATH308 que contenía las retromutaciones Y49S, Y36F, F4V, G64S y S67Y y la versión pATH309 que contenía las retromutaciones Y49S, G64S y S67Y, en asociación con la cadena pesada quimérica, ambas generaron anticuerpos que se unían a S1P del mismo modo que el anticuerpo quimérico tal como se determina con ELISA. Las 2 mutaciones Y36F y F4V no se consideraron retromutaciones necesarias desde el punto de vista de unión a S1P. La modificación de 3 a 5 retromutaciones en el marco conservado de VL fue necesario para restaurar la actividad.

La incorporación de la retromutación V37M de Vernier en el marco conservado humano de la cadena pesada, en asociación con la cadena ligera quimérica, fue suficiente para restaurar un comportamiento de unión similar al del anticuerpo quimérico (Figura 10 11).

En resumen, la humanización del dominio V_H de LT1002 necesitó solamente un aminoácido de la secuencia marco conservada de murino mientras que el dominio de marco conservado de V_L de murino, tuvo que retener tres o cinco restos para conseguir una unión equivalente al precursor murino LT1002.

e. Optimización de un candidato de dirección humanizado

El anticuerpo anti-S1P murino contiene un resto de cisteína libre en CDR2 (Cys50) de la cadena pesada que podría causar potencialmente una cierta inestabilidad de la molécula de anticuerpo. Usando mutagénesis dirigida al sitio, se crearon variantes de pATH201 con sustitución del resto de cisteína con alanina (huMAbHCcysalaLCs) (pATH207), glicina (huMAbHCcysalaLC₃), serina (huMAbHCcysserLC₃), y fenilalanina (huMAbHCcyspheLCs). La cadena pesada mutante de cisteína también se sometió a ensayo con la cadena ligera humanizadas (pATH 308) que contenía 5 retromutaciones (huMAbHCcysalaLCs = LT1009). Las variantes se expresaron en células de mamífero y a continuación se caracterizaron en un panel de ensayos *in vitro*. De forma importante, la velocidad de expresión de las variantes humanizadas era significativamente mayor que la de chMAb S1P.

f Caracterización detallada del candidato de dirección humanizado

i. Especificidad. Las variantes humanizadas se sometieron al ensayo de especificidad en un ensayo de ELISA competitivo 30 (Figura 1) frente a S1P y varios biolípidos. Este ensayo tiene el beneficio añadido de permitir el mapeo de epítomos. El anticuerpo humanizado LT1009 no demostró reactividad cruzada con la esfingosina (SPH), el precursor metabólico inmediato de S1P, o LPA (ácido lisofosfatídico), una molécula de señalización extracelular importante que es estructural y funcionalmente similar a la S1P. Además, rhuMAb S1P no reconocía a otros lípidos y metabolitos estructuralmente similares, incluyendo ceramida (CER), ceramida-1-fosfato (C1P). sin embargo, tal como se esperaba, LT1009 dio reacción cruzada con la esfingosil fosfocolina (SPC), un lípido en el que los tres grupos fosfato de S1P están unidos con un resto de colina. De forma importante, todas las variantes humanizadas presentaron un perfil de especificidad comparable con el anticuerpo de ratón.

ii. Afinidad de unión. Las medidas de Biacore de unión a IgG a un chip revestido con S1P mostraron que las variantes LT1004 o LT1006 presentaban afinidad de unión en el intervalo nanomolar bajo similar a chMAb S1P tal como se muestra en la Figura 11. Las variantes humanizadas LT1007 y LT1009 en las que el resto de cisteína se sustituyó con alanina presentaban una afinidad de unión en el intervalo picomolar similar al precursor murino LT1002 (Sphingomab™).

iii. Estabilidad. Las variantes humanizadas se sometieron ensayos de estabilidad después de la estimulación a temperatura elevada. Los puntos medios aproximados de las transiciones sin plegamiento térmico (T_M) se determinaron para cada variante humanizada sometiendo a los sobrenadantes a temperaturas que variaban de 60 a 74 °C. Estas temperaturas se eligieron en base al perfil de desnaturalización observado para la molécula de anticuerpo murino después de termoestimulación entre un intervalo amplio de temperaturas entre 50 y 80 °C. las propiedades de unión de cada variante se determinaron antes y después de la termoestimulación. El anticuerpo murino presentó una T_M de 65 °C. la variante huMAbHC_{CysAla}LC₅ (LT1009) presentó una T_M superior en comparación con todas las demás

variantes. La Tabla 7 muestra los candidatos humanizados de dirección y sus características.

Tabla 7: Candidatos a mAb a S1P humanizado de dirección y características Se indica el número de mutaciones en las cadenas pesadas y ligeras. La columna de descripción proporcionar la identidad de las cadenas pesadas y ligeras.

mAb	Descripción	Mutaciones en la Cadena Pesada		Mutaciones en la Cadena Ligera		Actividad <i>In vitro</i>	
		CDR	Marco conservado	CDR	Marco conservado	Afinidad de Unión (K _D)	Especificidad (ELISA)
LT1002	mAb Murino Sphingomab	N/D	N/D	N/D	N/D	0,026 ± 0,000 nM	Elevada
LT1004	HuHCLC ₃ pATH201HC pATH309LC	0	1	0	3	1,060 ± 0,010 nM	Elevada
LT1006	HuHCLCs pATH201HC pATH308LC	0	1	0	5	0,690 ± 0,010 nM	Elevada
LT1007	HuHC _{CysAla} LC3 pATH207HC pATH309LC	1	1	0	3	0,0414 ± 0,0004 nM	
LT1009	HuHC _{CysAla} LCs pATH207HC pATH308LC	1	1	0	5	0,056 ± 0,001 nM	Elevada

5

iv. Secuencias

Al igual que con los anticuerpos de origen natural, LT1009 incluye tres regiones que determinan la complementariedad (cada una, una "CDR") en cada uno de los dos polipéptidos de cadena ligera y cada uno de los dos polipéptidos de cadena pesada que comprende cada molécula de anticuerpo. Las secuencias de aminoácidos para cada una de estas seis CDR se proporcione inmediatamente a continuación ("VL" designa la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina, mientras que "VH" designa la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina):

10

CDR1 VL: ITTTDIDDDMN [SEC ID N°: 10]
 CDR2 VL: EGNILRP [SEC ID N°: 11]
 CDR3 VL: LQSDNLPFT [SEC ID N°: 12]
 CDR1 VH: DHTIH [SEC ID N°: 13]
 CDR3 VH: GGFYGSTIWFDF [SEC ID N°: 15]
 CDR2 VH: AISPRHDITKYNEMFRG [SEC ID N°: 31]

15

El nucleótido y las secuencias de aminoácidos para los polipéptidos de cadena pesada y ligera de LT 1009 se enumeran inmediatamente a continuación:

20

Secuencia de aminoácidos de LT1009 HC del dominio variable [SEC ID N°: 32]:

```

1  mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
51  htihwmrqmp gqglewmgai sprhditkyn emfrgqvtis adkssstayl
101 qwsslkasdt amyfcarggf ygstiwfdw gqgtmvtvss

```

Secuencia de aminoácidos de LT1009 LC del dominio variable [SEC ID N°: 33]:

```

1  msvptqvlgl lllwltidarc ettvtqpspsf lsasvgdrvt itcitttdid
51  ddmnwffqep gkapkllise gnilrpgvps rfsssgygtf flltisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfgq gtkleik

```

Secuencia de nucleótidos de LT1009 HC [SEC ID N°: 34]:

ES 2 524 059 T3

```

1 aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttctctg tctttctgtc
51 cgtgaccaca ggcgtgcatt ctgaggtgca gctgggtgag tctggagcag
101 aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctctgtca gagttttgga
151 tacatcttta tcgaccatac tattcaactg atgcgccaga tgcccgggca
201 aggcctggag tggatggggg ctatttctcc cagacatgat attactaaat
251 acaatgagat gttcaggggc caggteacca tctcagccga caagtccagc
301 agcaccgcct acttgcaagt gagcagcctg aaggcctcgg acaccgccat
351 gtatttctgt gcgagagggg ggttctacgg tagtactatc tggtttgact
401 tttggggcca agggacaatg gtcaccgtct cttcagcctc caccaagggc
451 ceatcggctt tccccctggc accctctctc aagagcaact ctgggggac
501 agcggccctg ggcctgctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg
551 tgtcgtggaa ctcagggccc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct
601 gtcctacagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc
651 ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc
701 ccagcaacac caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga
751 gggagggtgt ctgctggaag ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcac
801 ccggctatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc cgtctgcctc
851 ttcaccggga ggctctgcc cgccccactc atgctcaggg agagggtctt
901 ctggcttttt ccccaggctc tgggcaggca caggctaggt gccctaacc
951 caggccctgc acacaaagg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc
1001 catatccggg aggaccctgc cctgacctc agccccccc aaaggccaaa
1051 ctctccactc cctcagctcg gacacctct ctctcccag attccagtaa
1101 ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca
1151 tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag gcctcgccct ccagctcaag
1201 gggggacagg tgccttagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg
1251 ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg
1301 gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga
1351 tctcccggac cctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa
1401 gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa
1451 tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg
1501 tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac
1551 aagtgcaagg tctccaacaa agcctccca gccccatcg agaaaacat
1601 ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga
1651 ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga gtgaccgctg tacciaacctc
1701 tgteccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat
1751 cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa
1801 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc
1851 ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct
1901 tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
1951 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac
2001 gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atag

```

Secuencia de aminoácidos de LT1009 HC [SEC ID N°: 35]:

```

1 mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid
51 htihwmrqmp gqglewmgai sprhditkyn emfrgqvtis adkssstayl
101 qwsslkasdt amyfcarggf ygstiwfdw gqgtmvtvss astkgpsvfp
151 lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsaltsgv htfpavlqss
201 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvap ellggpsvfl
251 fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vkfnwyvdgv evhnaktkpr
301 eeqynstyrv vsvltvlhqd wlngkeykck vsnkalpapi ektiskakgg
351 prepqvytlp psreemtknq vsltclvkgf ypsdiavewe sngqpennyk
401 ttpvldsdg sfflyskltv dksrwqqgnv fscsvmheal hnhytqksls
451 lspgk

```

Secuencia de nucleótidos de LT1009 LC [SEC ID N°: 36]:

```

1   aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc cagggtgctgg gactgctgct
51  gctgtggctg acagacgccc gctgtgaaac gacagtgacg cagtctccat
101 ccttctctgtc tgcattctgta ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc
151 accactgata ttgatgatga tatgaactgg ttccagcagg aaccagggaa
201 agcccctaag ctctctgatct ccgaaggcaa tattctctcgt cctgggggtcc
251 catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc
301 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactggt tgcagagtga
351 taacttacca ttcactttcgg gccaaaggac caagctggag atcaaacgta
401 cgggtggctgc accatctgtc ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg
451 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag
501 agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact
551 cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
601 agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta
651 cgccctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct
701 tcaacagggg agagtgttag

```

Secuencia de aminoácidos de LT1009 LC [SEC ID N°: 37]:

```

1   msvptqvlgl lllwltldarc ettvtqspfs lsasvqdrvt itcitttddid
51  ddmnwfgqep gkapkllise gnirpvgvps rfsssgygtf ftltisklqp
101 edfatyyclq sdnlpftfqq gtkleikrtv aapsvfifpp sdeqlksqta
151 svvcllnnfy preakvqkwv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt
201 lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec

```

Ejemplo 13: Producción y purificación de mAb a S1P Humanizado

- 5 Este ejemplo describe la producción de un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante (LT1009; Sonepizumab™) que se une con alta afinidad al lípido bioactivo esfingosina-1-fosfato (S1P). LT1009 es un anticuerpo de isotipo IgG1k de longitud total formado por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas con un peso molecular total de 150 kDa. La cadena pesada contiene un sitio de glicosilación unido a N. La naturaleza de la estructura del oligosacárido todavía no se ha determinado pero se espera que sea una estructura biantenaria compleja con un núcleo de fucosa. La naturaleza de la glicofoma que será predominante no se conoce en este estadio. Se espera una cierta heterogeneidad C-terminal debido a la presencia de restos de lisina en el dominio constante de la cadena pesada. Las dos cadenas pesadas se acoplan covalentemente entre sí a través de dos enlaces disulfuro entre cadenas, que es coherente con la estructura de una IgG1 humana.

- 15 LT1009 se derivó originalmente de un anticuerpo monoclonal de murino (LT1002; Sphingomab™) que se producía usando hibridomas generados a partir de ratones inmunizados con S1P. La humanización del anticuerpo murino implicaba la inserción de las seis CDR de murino en lugar de las de un marco conservado de un anticuerpo humano seleccionado por su similitud estructural con el anticuerpo precursor murino. Se fabricaron una serie de sustituciones en el marco conservado para modificar el anticuerpo humanizado. Estas sustituciones se denominan retromutaciones y sustituyen restos humanos con murinos que desempeñan un papel significativo en la interacción del anticuerpo con el antígeno. La versión humanizada final contiene una retromutación de murino en el marco conservado humano del dominio variable de la cadena pesada y cinco retromutaciones de murino en el marco conservado humano del dominio variable de la cadena ligera. Además, un resto presente en la CDR N° 2 de la cadena pesada se sustituyó con un resto de alanina. Se mostró que esta sustitución aumentaba la estabilidad y la potencia de la molécula de anticuerpo.

- 25 Los dominios variables humanizados se clonaron en el sistema de expresión genética GS de Lonza para generar el plásmido pATH1009. Este sistema de expresión consiste en un vector de expresión que lleva los dominios constantes de los genes de anticuerpo y el marcador seleccionables glutamina sintetasa (GS). GS es la enzima responsable de la biosíntesis de la glutamina a partir de glutamato y amoniaco. El vector que lleva tanto los genes de anticuerpo como el marcador seleccionable se transfecta en la línea celular huésped patentada de ovario de hámster chino (CHOK1SV) adaptada para el crecimiento del medio sin suero y proporciona suficiente glutamina para que la célula sobreviva sin glutamina exógena. Además, el inhibidor de GS específico, metionina sulfoximina (MSX), se complementa en el medio para inhibir la actividad de GS endógena de modo que solamente pueden sobrevivir las líneas celulares con actividad de GS proporcionada por el vector. Las células transfectadas se seleccionaron por su capacidad para crecer en medio sin glutamina en presencia de MSX y se seleccionaron aislados para alto nivel de secreción de LT1009 activo. A continuación, se produjeron estudios de materiales para toxicología y desarrollo clínico para desarrollo de toxicidad y clínico.

Depósitos de la ATCC: StB12 de *E. coli* que contiene el plásmido pATH1009 se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (número de depósito PTA-8421). La línea celular de CHO LH1 275 transfectada con plásmido de ADN pATH1009 también se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (número de depósito PTA-8422).

Ejemplo 14: Fabricación del mAb humanizado

Por lo general, el procedimiento de producción implica tres etapas: preparación de la siembra, preparación del inóculo, y la producción del cultivo. Todas las etapas usan reactivos sin suero y medio de crecimiento de cultivo celular bajo en proteínas. Para iniciar la preparación de la siembra, se usaron células del banco de células de trabajo; las células se subcultivan cada tres a cuatro días y después de un periodo prescrito en el cultivo de preparación de la siembra, se inicia la preparación de la inoculación. El medio selectivo (medio sin MTX) se usa preferentemente para expandir la célula para la introducción en la etapa de producción. Las células se expanden mediante subcultivo en serie en recipientes de volumen creciente. En un número determinado de días en la preparación del inóculo, comienza la etapa de producción. El cultivo de producción se realiza en un biorreactor de 200 l, 400 l, 2000 l, o 20000 l de volumen. A continuación se describe un ejemplo de un biorreactor.

Ejemplo de biorreactor: La ampliación de los biorreactores de 2 l evolucionara primero en un tanque Applikon agitado de 15 l, a continuación secuencialmente hasta un biorreactor de 50 l, un biorreactor de 200 l y por último un biorreactor de 2000 l (todo construido en la misma escala). Las características de estos tanques son las que siguen a continuación:

Fabricante: ABEC, Inc.

Fabricado por ASME, Sección VIII Código de Recipiente de Presión. Las superficies de contacto son de acero inoxidable 316L.

Unidad de desplazamiento inferior, diseño de ABEC

Impulsor de baja cizalla de acero inoxidable 316L, pulido a 0,36-0,50 mm y pasivado. Diámetro ~1/2 de diámetro del recipiente.

Controles: PLC de Control Lógico Allen Bradley, con interfaz de visión del operador Versa.

Agitación: sensor Allen Bradley, control de PLC A-B de salida para VFI para el control de RPM.

Temperatura: Control doble de sensor de RTD de platino de 100 ohm, control del calor de PLC A-B, válvulas de frío y de vapor w/bomba de recirculación. Ciclo de esterilización automática con el biorreactor vacío.

pH: sensor Ingold, relleno de gel, presurizable, control de PLC A-B para burbujeo de CO₂.

Oxígeno disuelto: sensor de electrodo polarográfico Ingold, control de PLC A-B para burbujeo de O₂.

Flujo de aire y gas: Los sensores son Caudalímetros Másicos Térmicos de Four Brooks para burbujeo de aire, O₂, N₂ y CO₂, también se suministra una masa térmica de Brooks para la superposición de aire, control de PLC A-B de flujos de gas para control de pH automático, DO automático o manual de todo el flujo de gas a través de PLC A-B.

Presión del Recipiente: El sensor es un transductor de tipo diafragma sanitario Rosemount, el control es control de PLC A-B del transductor con una válvula de control de la presión en la parte posterior.

Controlador Lógico Programable (PLC): Sistema Control Logix Allen Bradley para control del bucle secuencial de los procedimientos tal como se indica. Software: la programación de PLC usar el software Rockwell (Allen Bradley) RS Logix 5000.

Interfaz de Máquina Humana (HMI): La interfaz del operador local es en un ordenador Allen Bradley HMI Verso View Industrial con entrada de FPD/pantalla táctil integrada en comunicación con el PLC a través de Ethernet. El software es software Rockwell Software RS View 32.

Ejemplo de Procedimiento de Producción.

Biorreactor de acero inoxidable agitado con control de temperatura, oxígeno disuelto de pH.

La densidad de siembra se determina para el rendimiento óptimo.

Por lo general se usa medio sin suero.

Es un procedimiento con lotes alimentados.

Por lo general con un desplazamiento de temperatura.

La duración del cultivo en el biorreactor se espera que sea de 8 a 14 días.

Viabilidad en el momento de la cosecha a definir.

La cosecha se eliminará por filtración.

La cosecha se almacenará a 2-8 °C después de la eliminación y antes de la purificación.

Ejemplo 15: Purificación a gran escala de mAb humanizado

El proceso de purificación de la sustancia farmacológica consiste por lo general en cuatro etapas: cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico (Q sepharose), cromatografía de intercambio catiónico (CM sepharose), y ultrafiltración/diafiltración (UF/DF). La columna de afinidad es por lo general la primera etapa después de la cosecha y la eliminación. Por lo general, esta columna usa una resina de proteína A inmovilizada. Esta etapa de afinidad purifica el anticuerpo con respecto a las proteínas de la célula huésped y del ADN. Con el fin de inactivar los virus potenciales, por lo general en eluato se somete a un proceso de inactivación del virus seguido de una etapa de cromatografía de intercambio aniónico para reducir las proteínas de la célula huésped, ADN, proteína A, y virus potenciales. A continuación, por lo general se usa una etapa de cromatografía de intercambio catiónico para reducir las cantidades residuales de las proteínas de la célula huésped y agregados de anticuerpos. Por último, la combinación se diafiltra a continuación y se concentra adicionalmente.

Procedimiento de purificación representativo:

La cosecha se puede concentrar y hacer un intercambio de tampón antes de la columna de Proteína A. la siguiente etapa del procedimiento es la cromatografía de afinidad en columna de Proteína A. El anticuerpo unido se eluye eluyendo con un tampón a pH bajo. El eluato de Proteína A se mantiene durante un período el tiempo con el fin de inactivar los virus.

- 5 La siguiente etapa del procedimiento puede ser una cromatografía de intercambio iónico sobre una columna Q(+) en condiciones en las que el producto fluye a través de y los contaminantes, tales como ADN y proteínas de flocos que se unen a la resina de la columna.

La siguiente etapa del procedimiento puede ser una segunda cromatografía de intercambio iónico sobre una columna S(-) en condiciones en las que los contaminantes fluyen a través de la columna. Se puede usar una etapa de columna de interacción hidrófoba en lugar de la etapa de la columna S(-). La siguiente etapa del procedimiento probablemente va a ser una etapa de retirada de virus por nanofiltración, usando un filtro DV20 o Planova. El producto fluye a través del filtro. Las etapas finales del procedimiento son la diafiltración en el tampón de la formulación de la sustancia del fármaco final y ultrafiltración para conseguir la concentración de la proteína diana.

Ejemplo 16: Actividad biológica de las variantes humanizadas de un anticuerpo anti-S1P murino.

15 Ensayos celulares *in vitro*

Los anticuerpos humanizados se sometieron a ensayo por su capacidad para alterar la supervivencia de las células tumorales en presencia de agentes quimioterapéuticos tal como se muestra en la Figura 12. Se expusieron células tumorales SKOV3 a Taxol, un agente quimioterapéuticos que induce la muerte de las células tumorales por activación del ejecutor apoptótico, caspasa-3. S1P fue capaz de disminuir la activación de la caspasa-3 inducida por Taxol y/o la muerte celular en comparación con las células de control sin tratar. Se realizaron ensayos de apoptosis tal como lo recomienda el fabricante (Promega, N° de Cat. G7792). En resumen, se sembraron células A549 (2500 células por pocillo) en placas de 96 pocillos y se permitió que crecieran hasta una confluencia de un 80 % antes del tratamiento. A continuación, las células se trataron con y sin Paclitaxel 0,1-1 μM (Sigma, N° de Cat. T 7409), S1P 0,1-1 μM y 1 $\mu\text{g/ml}$ del mAb anti-S1P, en medios de McCoy durante 48 h. Después de 48 horas, el tampón de ensayo de caspasa se añadió a las células. La actividad de la caspasa-3 en el sobrenadantes Emilio con el kit para Ensayo de Caspasa-3/7 Homogénea Apo-One (Promega, N° de Cat. G7792) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La actividad de la caspasa-3/7 se expresa como el múltiplo del aumento en la señal eflorescencia con respecto a las células tratadas con vehículo.

La activación de la Caspasa-3 aumento mediante la adición de mAb anti-S1P en presencia de S1P, lo que sugiere que el efecto anti-apoptótico protector de S1P se eliminó por absorción selectiva de S1P por el anticuerpo. Ambas variantes de anticuerpo humanizado, huMAbHCLC₃ (LT1004) y huMAbHCLC₅ (LT1006), presentaron una actividad superior en comparación con LT1002. En paralelo, todas las variantes sometidas al ensayo por sus efectos sobre la liberación de citoquina inducida por S1P a partir de células cancerosas. Se sabe que S1P provoca una liberación significativa de IL-8 en los medios acondicionados con células a partir de células cancerosas. La adición del mAb antiS1P de control de ratón redujo la liberación de IL-8 a partir de células de cáncer de ovario de una forma dependiente de la concentración. Las dos variantes humanizadas huMAbHC_{CysAla}LC₃ (LT1007) y huMAbHC_{CysAla}LC₅ (LT1009) presentaron una reducción mayor de la liberación de IL-8 en comparación con HuMAbHCLC₃ (LT 1004) y huMAbHCLC₅ (LT 1006).

40 Ejemplo 17: Eficacia *in vivo* de mAb murino (Sphingomab) frente a mAb humanizado (Sonepcizumab) en un modelo animal de neovascularización

Neovascularización coroidea (CNV) se refiere al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que se originan en la coroides a través de una ruptura de la membrana de Bruch en el epitelio pigmentario subretiniano (sub-RPE) o en el espacio subretiniano en el ojo. CNV es una causa principal de pérdida visual en la degeneración macular y en otras afecciones oculares.

45 En este ejemplo se usa un modelo de ratón de CNV para la evaluación de los mAb frente a S1P.

Las variantes de anticuerpo humanizado y el anticuerpo murino se compararon por su capacidad para inhibir la neovascularización en el modelo animal de CNV de la AMD tal como se muestra en la Figura 13. los ratones se administraron con 0,5 μg dos veces (Día 0 y Día 6) del murino (Mu; LT1002), las variantes humanizadas [LC3 (LT1004), LC5 (LT1006), HC_{Cys}LC3 (LT 1007) y HC_{Cys}LC5 (LT1009)] o el mAb no específico (NS) mediante administración intravítrea y a continuación se sometieron a rotura con láser de la membrana de Bruch. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la cirugía con láser. Los ratones de control se trataron con tampón acuoso (PBS) o un anticuerpo específico de isotipo coincidente. Tres de las variantes humanizadas inhibieron la angiogénesis básicamente de forma equivalente a la del anticuerpo murino tal como se evalúa por medida del área de la CNV. Los volúmenes de la lesión de la CNV se representan como medias :LSEM. La variante humanizada que contiene 5 retromutaciones en la cadena ligera y con una mutación de cisteína en CDR2 de la cadena pesada (huMAbHC_{Cys}LC₅; LT 1009) suprimieron la neovascularización de forma notable. Esta diferencia era muy estadísticamente significativa.

Para la inducción de la CNV, los ratones anestesiaron con una mezcla de ketamina (14 mg/kg) y xilazina (30 mg/kg) en solución salina estéril administrada por vía intraperitoneal ha una dosis de 5 μl por 20 g de peso corporal. A

continuación, sus pupilas se dilataron con una gota en cada ojo de tropicamida oftálmica (0,5 %) y fenilenefrina (2,5 %). A continuación, se usará un láser oftálmico de color verde de argón (Oculight GL 532 nm, Iridex Corporation, Mountain View, CA) acoplado a una lámpara de hendidura ajustada para administrar un pulso de 100 mseg a 150 mW con un tamaño de mancha de 50 μm para romper la membrana de Bruch en tres cuadrantes del ojo derecho localizados aproximadamente 50 μm del disco óptico en posiciones relativas a las 9, 12 y 3 en punto. El ojo izquierdo sirvió como control sin lesión en todos los casos.

Las lesiones de la CNV morfológica y volumétrica se emitieron tal como sigue a continuación. Dos semanas después de la inducción de la CNV con láser, los animales se sacrificaron con sobredosis de una mezcla de ketamina-xilazina, a continuación experimentaron una percusión corporal total a través de la función cardíaca con 6 ml de paraformaldehído al 4 % en PBS, pH 7,5, (fijador) tal como se ha descrito anteriormente (Sengupta y col., 2003). A continuación, los ojos se enuclearán, se hará una punción con 27 g con una aguja de 1 mm posterior al limbo, y se sumergirán en fijador durante 1 h a temperatura ambiente, a continuación se lavan 2X por inmersión en PBS durante 30 min. a continuación, los ojos se diseccionarán para aislar el segmento posterior que consiste el epitelio del pigmento retiniano, la lámina coriocapilar y la esclerótica. A continuación, el tejido se permeabilizó y se hizo reaccionar con aglutinina I de *R. communis* conjugada con rodamina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para detectar la lesión de la CNV tal como se ha descrito anteriormente (Sengupta y col., 2003; Sengupta y col., 2005). A continuación, las copas posteriores se cortaron con láminas 4-7 radiales, y se montaron de forma plana en portaobjetos de microscopio con una gota de medio antidesfijado Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, VT) para captura de imagen digital por epifluorescencia Axioplan 2 de Zeiss con cámara digital de alta resolución Spot de RGB y microscopía confocal de exploración con láser (BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA).

Las imágenes digitales capturadas se evaluaron morfosimétricamente usando el software ImageJ (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Las imágenes se dividieron en canales de RGB separados para análisis de los canales rojo y verde tal como sigue a continuación: 1) se aplicó una calibración para el objetivo y microscopio específicos para establecer la relación de píxel a longitud; 2) se aplicó un umbral usando el algoritmo de Otsu; 3) las imágenes se harán binarias; 4) se describe una región de interés (ROI) para incluir toda el área de la lesión; 5) se realizó un análisis de partículas para cuantificar el área de píxeles por encima del nivel de umbral dentro de la ROI. Para el análisis volumétrico, el procedimiento fue similar al que se ha descrito anteriormente, excepto en que se usó una captura de de la serie z. a continuación, la suma del área de la lesión a través de la serie z se multiplicó por el espesor de z (por lo general 4 μm) para obtener el volumen de la lesión.

Los productos farmacológicos sometidos a ensayo en este modelo fueron LT1002 (mAb murino a S1P; Sphingomab™); LT1004 (mAb humanizado), LT1006 (mAb humanizado), LT1007 (mAb humanizado) y LT1009 (mAb humanizado; Sonepcizumab™). Además se incluyeron controles de vehículo salino y de anticuerpo no específico (NSA). Tal como se muestra en la Figura 13, tanto el mAb murino LT1002 (Sphingomab™) como el mAb humanizado LT1009 (Sonepcizumab™) disminuyeron significativamente el tamaño de la lesión en este modelo de ratón de la CNV. Todos los mAb sometidos a ensayo mostraron una reducción de aproximadamente un 80-98 % del tamaño de la lesión, que era significativo ($p < 0,001$ frente a solución salina) en todos los casos. Además, LT1007 y LT1009 también mostraron una inhibición significativa ($p < 0,05$) en comparación con el control de anticuerpo no específico. El porcentaje de inhibición del tamaño de la lesión era de aproximadamente un 80 % para LT1002 (murino), un 82 % para LT1004 (humanizado), un 81 % para LT1006 y un 99% para LT1009. Por lo tanto, LT1009 era la variante de mAb humanizado más activa en este modelo de neovascularización *in vivo*.

Ejemplo 18: Determinación de la Respuesta a la Dosis de Sonepcizumab

Los ratones ($n = 10$) recibieron una sola inyección intravítrea bilateral de dosis crecientes de sonepcizumab (0,05, 0,5, 1,0 o 3,0 $\mu\text{g}/\text{ojo}$) o una dosis elevada de anticuerpo no específico (NS) (3,0 $\mu\text{g}/\text{ojo}$) un día antes de la rotura de la membrana de Bruch inducida con láser. Catorce días después de la rotura con láser, los ratones anestesiaron y se perfundieron con dextrano marcado con fluoresceína y se prepararon monturas planas coroidales para el análisis de del tamaño de la lesión de la CNV.

En este estudio, el efecto de la cantidad de dosis y el intervalo de dosis sonepcizumab en la inhibición de la CNV se examinaron usando otro procedimiento validado para cuantificar el área de la CNV en la que los animales se perfundieron con dextrano marcado con fluoresceína justo antes del sacrificio. El sonepcizumab indujo una reducción dependiente de la dosis en el área de la CNV que da como resultado una inhibición máxima de aproximadamente un 50 %, a una dosis de 3,0 $\mu\text{g}/\text{ojo}$. Esta reducción fue significativa ($p < 0,0001$ en comparación con el control de anticuerpo no específico usando un ensayo de t no pareada). En el estudio de la frecuencia de la dosificación, se observó una eficacia similar entre los grupos tratados con Sonepcizumab en un solo punto temporal (día 0) o en múltiples puntos temporales (días 0 y 7) durante el estudio de 14 días.

La inhibición máxima de aproximadamente un 50 % observada con el tratamiento con Sonepcizumab (3,0 $\mu\text{g}/\text{ojo}$) se compara favorablemente con los datos publicados anteriormente en el mismo modelo y realizado por el mismo investigador que demuestra la reducción en el área de la CNV por la Trampa de VEGF (4,92 $\mu\text{g}/\text{ojo}$). Saishin, y col. *J Cell Physiol*, 2003, 195 (2): páginas 241-8. Las "trampas" (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.) son fusiones entre dos componentes receptores distintos y la región Fc de una molécula de anticuerpo denominada región Fc y Regeneron está buscando la Trampa de VEGF para la enfermedad ocular y cáncer. Una comparación de estos dos estudios

independientes desvela que la reducción del tamaño de la lesión de la CNV por Sonepcizumab era de 20 puntos porcentuales mayor que la observada con la Trampa de VEGF. Por lo tanto, estos datos no solamente confirman los hallazgos preliminares de los inventores con respecto a la capacidad de una terapia anti-S1P para reducir la formación de la lesión en el modelo murino de la CNV, sino que también demuestran el aumento de la eficacia del anticuerpo humanizado, sonepcizumab, para inhibir la formación de lesiones de la CNV y proporcionar un conocimiento de un efecto antipermeabilidad.

Ejemplo 19: Eficacia de Sonepcizumab en la Reducción del Desarrollo de Neovascularización de la Retina en un Modelo Murino de Retinopatía del Prematuro.

Se colocaron ratones C57BL/6 (n = 7) en oxígeno al 75 % de 7 días de vida y en el día 12 de vida se devolvieron al aire de la habitación y se les administró una inyección intraocular de 3 µg de sonepcizumab en un ojo y el vehículo en el ojo contralateral. En el día 17, los ratones recibieron una inyección intraocular de anticuerpo anti-PECAM marcado con FITC y después de 8 horas, los ratones se sacrificaron y los ojos se retiraron y se fijaron en formalina tamponada con PBS a temperatura ambiente durante 5 horas. Las retinas se diseccionaron y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato que contenía Triton X-100 al 0,25 % y se montaron totalmente. Las láminas se visualizaron con un microscopio de Fluorescencia de Nikon y el área de la NV de la retina por retina se midió por análisis de imagen.

De acuerdo con la reducción de la CNV observada en el modelo murino de rotura con láser, también se observó una reducción drástica de la CNV en un modelo murino de retinopatía del prematuro (ROP). La administración intravítrea de Sonepcizumab (3,0 µg/ojo) dio como resultado una reducción de casi 4 veces en la neovascularización de la retina en comparación con solución salina de control. Estos datos confirman la eficacia de sonepcizumab para inhibir la angiogénesis patológica ocular en los lechos vasculares tanto de la retina como de la coroides ya sea inducida a través de isquemia o de rotura de la membrana de Bruch.

Ejemplo 20: Efecto de Sonepcizumab en la Angiogénesis inducida por VEGF en un ensayo de Tapón de Matrigel

La neovascularización *in vivo* se realizó usando el ensayo de tapón de Matrigel GFR tal como se describe en Staton, y col., Int J Exp Pathol, 2004, 85 (5): p. 233-48. Ratones nu/nu de 4-6 semanas de edad se inyectaron en el costado izquierdo con 500 µl de Matrigel GFR enfriado con hielo. El Matrigel GFR se inyectó solo (control) o después de la adición de 10 µg/ml de VEGF complementado con 100 µg/ml de heparina. Los grupos consistieron en 3 animales para el control y tratamiento sonepcizumab. Los animales se trataron con la solución salina o sonepcizumab (10 mg/kg) 1 día antes de la implantación de Matrigel GFR y las dosis se administraron ip cada 72 horas durante la duración del experimento. Después de 12 días, los animales se sacrificaron; los tapones se extirparon y se fijaron inmediatamente en fijador sin cinc ni formalina durante la noche, se embebieron en parafina y se seccionaron (5 µm). Las secciones embebidas en parafina se tiñeron para CD31 (Pharmingen). Las imágenes (9 imágenes por sección, 3 secciones por tapón) se tomaron con una cámara digital de 20x de aumento y a continuación la tinción de CD31 positivo se cuantificó con el programa PhotoShop 6.0 y se expresaron como puntuación de la angiogénesis (píxel²) por ImageJ.

Los efectos antiangiogénicos de sonepcizumab eran evidentes en este ensayo de tapón de Matrigel. Tal como se esperaba, se indujo una neovascularización extensa (aprox 5,75x que se observó en el control sin tratar que carece de VEGF o sonepcizumab) en los tapones de Matrigel complementado con 10 µg/ml de VEGF. Es importante destacar que, el tratamiento i.p. sistémico con sonepcizumab antes de la inyección de Matrigel impidió de casi un 80 % de este aumento estimulado por VEGF de la densidad de los celularidad y los microvasos. Esta reducción es significativa (p < 0,05 en comparación con VEGF solo) y confirma la actividad antiangiogénica potente de sonepcizumab cuando se administra sistémicamente a animales y sugiere fuertemente que sonepcizumab es capaz de inhibir la angiogénesis inducida por VEGF de forma significativa. Este hallazgo es coherente con los datos del programa de oncología de Lpath mediante el cual ese anticuerpo S1P redujo los niveles en suero de varios factores angiogénicos, incluyendo VEGF, en un modelo ortotópico de cáncer de mama murino.

Un componente principal del crecimiento de los vasos sanguíneos asociado con la AMD es el reclutamiento de pericitos que envuelven y soportan el tubo endotelial en crecimiento. Jo, y col., Am J Pathol, 2006, 168 (6): p. 2036-53. Estudios en ratones transgénicos han demostrado que VEGF y PDGF-B son los factores principales que estimulan la infiltración y la diferenciación de los pericitos que conducen a la maduración y la estabilización de los vasos. Guo, y col., Am J Pathol, 2003, 162 (4): p. 1083-93; Benjamin, L.E., I. Hemo, y E. Keshet, Development, 1998, 125 (9): p. 1591-8. Es importante destacar que S1P estimula la transactivación de VEGF y PDGF. Por lo tanto, la capacidad de sonepcizumab para neutralizar indirectamente estos factores de crecimiento sugiere que sonepcizumab podría prevenir el crecimiento anómalo de los vasos de sangre durante la AMD.

Ejemplo 21: Sonepcizumab reduce significativamente la pérdida vascular después de la rotura con láser de la membrana de Bruch

La eficacia de sonepcizumab, administrado para inhibir la pérdida vascular (además de inhibir de la neovascularización tal como se ha mostrado anteriormente) se evaluó en un modelo murino de ruptura con láser de la membrana de Bruch.

Ratones C57BL/6 (n = 10) se sometieron a rotura con láser de la membrana de Bruch en 3 lugares en cada ojo y se les

administró una inyección intraocular de 3 µg de sonepcizumab en un ojo y vehículo en el ojo contralateral. Una semana después de la rotura con láser, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 12 µl/g de peso corporal de fluoresceína sódica al 1 % y se sacrificaron 5 minutos más tarde. Los ojos se extrajeron y se fijaron en formalina tamponada con PBS a temperatura ambiente durante 5 horas. A continuación, las retinas se diseccionaron, se lavaron y se incubaron con anti-PECAM-1 primaria. A continuación, las retinas se lavaron, se incubaron con anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-rata conjugada con rodamina), y a continuación se montaron de forma plana.

La cuantificación del área de lesión de la CNV se mide por tinción con PECAM-1. La cuantificación de la pérdida vascular se mide por tinción con fluoresceína sódica. El área total de las pérdidas de CNV = CNV + pérdida (verde) - área de CNV (rojo). Los valores representan la media ± ETM para n = 10 ratones/grupo. El área de neovascularización coroidea (teñida con PECAM-1) era de aproximadamente 0,015 mm² para los animales tratados con LT1009 y aproximadamente 0,03 mm² para los animales de control tratados con solución salina. Esta es una reducción de un 50 % en la neovascularización (p=0,018). El área de la pérdida de la neovascularización coroidea (teñida con fluoresceína) era de aproximadamente 0,125 mm² para los animales tratados con LT1009 y aproximadamente 0,2 mm² para los animales de control tratados con solución salina. Esto es aproximadamente una reducción de un 38 % (p=0,017) en la pérdida de los vasos sanguíneos.

Las imágenes inmunohistoquímicas representativas de la reducción de la neovascularización coroidea y la pérdida vascular en los ratones tratados con 33,0 µg/ojo del control de Sonepcizumab o PBS son coherentes con estos resultados. Por lo tanto, además de reducir la CNV, sonepcizumab redujo significativamente la pérdida vascular después de la rotura con láser del edema retiniano de la membrana de Bruch, que desempeña un papel importante en la pérdida de la agudeza visual, que se asocia con: (i) fugas de la neovascularización coroidea en la AMD y (ii) la rotura de la barrera hemato-retiniana en la diabetes. Gerhardt, H. y C. Betsholtz, Cell Tissue Res, 2003, 314 (1): p. 15-23. Sonepcizumab reduce la formación de vasos sanguíneos patológicos en el ojo, así como la pérdida vascular que da como resultado edema retiniano. Estos resultados son consistentes con los datos generados a partir de el experimento de cuantificación del área de CNV en el que los ratones se perfundieron con dextrano marcado con fluoresceína. La cuantificación de la CNV a través de este procedimiento se ve afectada sin duda por la permeabilidad vascular. Los resultados altamente favorables abogan por un efecto antipermeabilidad en el lecho vascular de la coroides. Teniendo en cuenta estos datos, los investigadores creen que sonepcizumab tiene el potencial de ser una monoterapia. Además, existe la posibilidad de un efecto sinérgico con los agentes actuales de bloqueo pan-VEGF-A.

Ejemplo 22: Reducción de la infiltración de macrófagos en la retina después del tratamiento con anticuerpo a S1P

La degeneración macular asociada a la edad (AMD) es una enfermedad asociada con el envejecimiento que destruye gradualmente la visión aguda y central. Hay dos tipos principales de degeneración macular. La forma seca o atrófica, que representa un 85-90 % de los casos de AMD, y la forma húmeda de AMD que se caracteriza por el crecimiento de vasos sanguíneos anómalos. La degeneración macular seca se diagnostica cuando manchas amarillentas conocidas como drusas comienzan a acumularse a partir de depósitos o residuos de tejido deteriorado principalmente en el área de la mácula. Se puede producir la pérdida gradual de la visión central. No existe un tratamiento eficaz para la forma atrófica más prevalente (seca) de AMD. La AMD atrófica se desencadena por anomalías en el epitelio pigmentario de la retina (RPE) que se encuentra debajo de las células fotorreceptoras y normalmente proporciona soporte metabólico crítico a estas células sensibles a la luz. Después de la disfunción del EPR, varillas maculares y conos se degeneran conduciendo a la pérdida irreversible de la visión. El estrés oxidativo, isquemia, formación de drusas, acumulación de lipofuscina, inflamación local y gliosis reactiva representan los procesos patológicos implicados en la patogénesis de la AMD atrófica. De estos procesos, la inflamación se está convirtiendo en un factor clave en el daño tisular. La infiltración de macrófagos en la mácula de los pacientes con AMD seca ha demostrado ser un componente importante de la respuesta inflamatoria perjudicial. Por lo tanto un agente que podría atenuar la infiltración de macrófagos sería un agente terapéutico valioso, al igual que la inhibición de la infiltración de macrófagos probablemente podría disminuir el daño tisular macular. Dicho agente también puede disminuir la velocidad a la que la AMD seca se convierte en AMD húmeda.

En un modelo de retinopatía isquémica e inflamatoria, en la actualidad se ha demostrado una inhibición de un 55 % de la infiltración de macrófagos después del tratamiento con un anticuerpo anti S1P. Estos datos se generaron usando el modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno bien establecido (también conocido como el modelo de retinopatía del prematuro (ROP)). Específicamente, los ratones C57BL/6 se colocaron en oxígeno al 75 % en el día 7 de vida y en el día 12 de vida se devolvieron al aire de la habitación y se les administró una inyección intraocular de 3 µg de anticuerpo anti S1P humanizado (LT1009, SonepcizumabTM) en un ojo y el vehículo en el otro ojo. En el día 17 de vida, los ratones recibieron una inyección intraocular de anticuerpo marcado con FITC a F4/80 (un marcador pan-macróforo) y después de 8 horas, los ratones se sacrificaron. Los globos se retiraron y se fijaron en formalina tamponada con PBS a temperatura ambiente durante 5 horas. Retinas se diseccionaron y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato que contenía Triton X-100 al 0,25 % y se montó totalmente. Las láminas se visualizaron con un Microscopio de Fluorescencia de Nikon y se cuantificaron los macrófagos de la retina. Los resultados se muestran en la Tabla 8 que sigue a continuación.

Tabla 8: Reducción de la infiltración de macrófagos en la retina por tratamiento con anticuerpo monoclonal humanizado a S1P

Nº de macrófagos por retina		% de reducción en la densidad de macrófagos	
Control salino	Anticuerpo S1P	Control salino	Anticuerpo S1P
2513 ± 115	1136 ± 33	100 ± 0,5	55,4 ± 1,3
P < 0,001		P < 0,0001	

5 En base a estos datos y el papel conocido de los macrófagos en la patogénesis de la AMD seca, se cree que los anticuerpos anti-S1P representan un agente terapéutico eficaz para el tratamiento de la AMD seca.

Ejemplo 23: Respuesta de Xenoinjerto de Tumor Colorrectal SC COLO205 en Ratones NCr Atímicos al Tratamiento con 25-75 mg/kg de LT1009, Solo y en Combinación con Avastin o Paclitaxel

10 El objetivo de este estudio era determinar la eficacia de LT1009, solo y en combinación con otros agentes anticáncer, para retrasar la progresión de los tumores de carcinoma colorrectal humano (COLO205) injertado se forma subcutánea (sc) y establecidos en ratones Ncr (nu/nu) hembra.

15 Se implantó sc, a ratones atímicos cerca del costado derecho, un fragmento por ratón de tumor COLO 205 a partir de un pasaje *in vivo*. Todos los tratamientos comenzaron el día en el que 60 ratones de cada experimento presentaban tumores con un tamaño que variaba de aproximadamente 100 a 200 mm³. A continuación, los ratones (n = 10 por grupo) se trataron con 25 mg/kg de LT1009, 50 mg/kg de LT1009, 40 mg/kg de Avastin, 50 mg/kg de LT1009 más 40 mg/kg de Avastin, 15 mg/kg de Paclitaxel o vehículo (solución salina). 25 o 50 mg/kg de LT1009 y solución salina se administraron ip una vez q3d en un volumen de 0,1 ml/20 g de peso corporal para la duración del experimento. El Avastin se administró iv a una dosificación de 40 mg/kg/dosis en una programación q7d, inyectado en un volumen de 0,1 ml/20 g de peso corporal. El Paclitaxel (control positivo), se administró iv a una dosificación de 15 mg/kg/dosis en una programación de q1d x 5, inyectado en un volumen de 0,1 ml/10 g de peso corporal. En el Día 21, la dosis de 25 mg/kg de LT1009 se elevó a 75 mg/kg de LT1009 para la duración del estudio.

25 Se observó diariamente la mortalidad de los animales. Las dimensiones del tumor y los pesos corporales se recogieron dos veces a la semana comenzando el primer día de tratamiento e incluyendo el día de la finalización del estudio. Cuando el tamaño medio del tumor en el grupo de control tratado con vehículo en cada estudio alcanzó aproximadamente 4.000 mg, el estudio finalizó. Los tumores de cada animal se recogieron, se registraron los pesos en húmedo, los tumores se procesaron para determinar las densidades microvasculares (MVD) mediante tinción con CD-31. Se calcularon los pesos del tumor (mg) usando la ecuación para una esfera elipsoide $(l \times w^2)/2 = \text{mm}^3$, en la que *l* y *w* se refieren a las dimensiones mayores y menores recogidas en cada medida y suponiendo una densidad unitaria (1 mm³ = 1 mg).

Tabla 9: Resumen numérico de los hallazgos de -Colo205

Tratamiento	Pesos Tumorales Finales (mg)	% de Reducción en Comparación con los Ratones Tratados con Vehículo
Vehículo	3047,25	-
50 mg/kg de LT1009	2071,17	32 %
25/75 mg/kg de LT1009	2465,60	20 %
Avastin	1967,90	35 %
Avastin + 50 mg/kg de LT1009	1614,40	48 %
Paclitaxel	0	100 %

30 50 mg/kg de LT1009 inhibieron básicamente la progresión del tumor (p < 0,018), tal como se mide con los pesos tumorales finales, en un 2 % cuando se compara con tumores de animales tratados con solución salina. 25/75 mg/kg de LT1009 también fue una dosis eficaz para reducir los pesos tumorales finales en un 20 %; sin embargo, esta reducción no era estadísticamente significativa. 50 mg/kg de LT1009 fue tan eficaz como Avastin en la reducción de los pesos tumorales finales (un 32 % frente a un 35 % de reducción, respectivamente). La combinación de LT1009 y Avastin era más eficaz que la del agente solo, lo que demuestra una reducción de un 48 % en los pesos tumorales

35

cuando se compara con los animales tratados con solución salina. Por lo tanto, parece que los efectos de LT1009 y Avastin son aditivos. El control positivo, Paclitaxel, se eliminó completamente de los tumores preestablecidos.

Ejemplo 24: Respuesta de Xenoinjerto de Tumor Colorrectal SC HT29 en Ratones NCr Atímicos al Tratamiento con 50 mg/kg de LT1009, Solo y en Combinación con Avastin y 5-FU

5 El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia antitumoral de LT1009, solo y en combinación con otros agentes anticáncer, frente a xenoinjertos de tumor de colon HT29 humano implantados sc en ratones atímicos NCr-*nu/nu* hembra.

10 Se implantó sc, a ratones atímicos cerca del costado derecho, un fragmento por ratón de tumor HT29 a partir de un pasaje *in vivo*. Todos los tratamientos comenzaron el día en el que 60 ratones de cada experimento presentaban tumores con un tamaño que variaba de aproximadamente 100 a 200 mm³. Había diez ratones por grupo de tratamiento. 50 mg/kg de LT1009 y solución salina se administraron ip q2d en un volumen de 0,1 ml/20 g de peso corporal para la duración del experimento. 75 mg/kg de 5-FU y 20 mg/kg de Avastin se administraron ip e iv alguna dosificación de 75 mg/kg/dosis y 20 mg/kg/dosis, respectivamente, q4d, inyectado en un volumen de 0,1 ml/10 g de peso corporal. La primera dosis de LT1009 consistía en 100 mg/kg administrados iv.

15 Se observó diariamente la mortalidad de los animales. Las dimensiones del tumor y los pesos corporales se recogieron dos veces a la semana comenzando el primer día de tratamiento e incluyendo el día de la finalización del estudio. Cuando el tamaño medio del tumor en el grupo de control tratado con vehículo en cada estudio alcanzó aproximadamente 4.000 mg, el estudio finalizó. Los tumores de cada animal se recogieron, se registraron los pesos en húmedo, los tumores se procesaron para la determinación de las MVD mediante tinción con CD-31. Se calcularon los pesos del tumor (mg) usando la ecuación para una esfera elipsoide $(l \times w^2)/2 = \text{mm}^3$, en la que *l* y *w* se refieren a las dimensiones mayores y menores recogidas en cada medida y suponiendo una densidad unitaria (1 mm³ = 1 mg).

Tabla 10: Pesos Tumoraes Finales - HT29

Tratamiento	Pesos Tumoraes Finales (mg)	Significancia (valor de p)	% de Reducción en Comparación con Ratones Tratados con Vehículo
Vehículo	2723,67	-	-
LT1009	2390,63	1,00	13 %
Avastin	1927,44	0,39	30 %
LT1009 + Avastin	1624,90	0,001	41 %
5-FU	1963,71	0,099	28 %
LT1009 + 5-FU	1948,00	0,049	29 %

25 50 mg/kg de LT1009 redujeron la progresión del tumor, tal como se mide con los pesos tumorales, en un 13 % aunque Avastin redujo los pesos tumorales en un 30 % cuando se compara con tumores de animales tratados con solución salina. La combinación de LT1009 y Avastin fue más eficaz que cualquier agente solo lo que demuestra una reducción estadísticamente significativa de un 41 % en los pesos tumorales cuando se compara con los animales tratados con solución salina. El tratamiento con 5-FU redujo los pesos tumorales en un 28 %. 5-FU mostró un efecto aditivo mínimo con LT1009 lo que demuestra una inhibición de un 29 % de los pesos tumorales finales.

30 **Ejemplo 25: Respuesta de Xenoinjerto de Tumor de Próstata SC DU145 en Ratones NCr Atímicos al Tratamiento con 50 mg/kg de LT1009, Solo y en Combinación con Avastin o Paclitaxel**

El objetivo de este estudio era determinar la eficacia de LT1009, solo y en combinación con otros agentes anticáncer, para retrasar la progresión de los tumores de carcinoma de próstata humana (DU145) insertados por vía subcutánea (sc) e implantados en ratones Ncr (nu/nu) hembra.

35 Se implantó sc, a ratones atímicos cerca del costado derecho, un fragmento por ratón de tumor DU145 a partir de un pasaje *in vivo*. Todos los tratamientos comenzaron el día en el que 60 ratones de cada experimento presentaban tumores con un tamaño que variaba de aproximadamente 100 a 200 mm³. A continuación, los ratones (n = 10/grupo) se trataron con 50 mg/kg de LT1009, 20 mg/kg de Avastin, 7,5 mg/kg de Paclitaxel, 50 mg/kg de LT1009 más 20 mg/kg de Avastin, 50 mg/kg de LT1009 más 7,5 mg/kg de Paclitaxel o vehículo (solución salina). 50 mg/kg de LT1009 y solución salina se administraron ip q2d en un volumen de 0,1 ml/20 g de peso corporal para la duración del experimento. Paclitaxel y Avastin se administraron iv and ip a una dosificación de 7,5 mg/kg/dosis y 20 mg/kg/dosis, q1d x5 y q4d, respectivamente, inyectados en un volumen de 0,1 ml/10 g de peso corporal. La primera dosis de LT1009 consistía en 100 mg/kg administrados iv.

45 Durante el transcurso del estudio, el crecimiento tumoral se controló midiendo los tumores sc en tres ejes y calculando el volumen. Al final del estudio, los pesos tumorales finales y los volúmenes se determinaron y a continuación los

ratones se sacrificaron, los tumores se recogieron. A continuación, se determinaron las densidades microvasculares (MVD) de los tumores mediante tinción con CD-31.

Tabla 11: Resumen numérico de hallazgos - DU145

Tratamiento	Presos Tumorales Finales (mg)	Significancia (valor de p)	% de Reducción en comparación con Ratones Tratados con Vehículo
Vehículo	2703	-	-
LT1009	2242	0,00	28 %
Avastin	578	0,00	79 %
LT1009 + Avastin	676	0,00	75 %
Paclitaxel	539	0,00	80 %
LT1009 + Paclitaxel	373	0,00	84 %

5 50 mg/kg de LT1009 redujeron la progresión del tumor de forma significativa ($p < 0,00$), tal como se mide con los pesos tumorales, en un 28 %. Avastin y Paclitaxel también redujeron de forma significativa ($p < 0,00$) en los pesos tumorales finales en un 80 % cuando se compara con los tumores de los animales tratados con solución salina. LT1009 no aumentó de forma significativa la actividad tumoral, tal como se mide con los volúmenes tumorales finales, de Avastin o Paclitaxel.

10 **Ejemplo 26: Respuesta de Xenoinjerto de Tumor de Mieloma Humano RPMI 8226 en Ratones CB17 SCID al Tratamiento con 25 mg/kg o 50 mg/kg de LT1009, Solo y en Combinación con Bortezomib**

El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia antitumoral de LT1009, solo y en combinación con el agente anticáncer Bortezomib, frente xenoinjertos de tumor de mieloma humano RPMI implantados sc en ratones CB17 SCID hembra.

15 Ratones atímicos (ratones hembra CB17 SCID, de 4-5 semanas de edad, con un peso de 18-22 g, obtenidos en Harlan) se inyectaron sc con células de RPMI 8226 cosechadas a partir de cultivo tisular ($\sim 1 \times 10^7$ células/ratón). Cuando los tumores crecieron hasta un tamaño de aproximadamente 100 mm³, los animales se unieron por parejas según el tamaño del tumor en grupos de tratamiento y de control (10 ratones por grupo). La dosificación inicial comenzó el Día 1 después de la unión por parejas. Los animales de todos los grupos se dosificaron en peso (0,01 ml por gramo; 10 ml/kg). El LT1009 en el vehículo se administró mediante inyección intraperitoneal (IP) una vez cada tres días hasta la finalización del estudio (Q3D hasta el final). Se administró Bortezomib mediante inyección intravenosa a través de la vena de la cola una vez cada tres días durante seis tratamientos (Q3D x 6). Para servir como control negativo, se administró vehículo de LT1009 (solución salina al 0,9 %) IP en una programación de Q3D hasta el final.

25 Los volúmenes tumorales medios individuales y del grupo \pm ETM se registran dos veces a la semana hasta la finalización del estudio comenzando el Día 1. El volumen medio final del tumor \pm ETM para cada grupo se indica a la finalización del estudio; los animales experimentan regresiones parciales o completas del tumor o los animales que experimentan muertes técnicas son almacenadas con los fármacos se eliminan de estos cálculos.

Tabla 12: Volúmenes Tumorales Finales - RPMI

Tratamiento	Pesos Tumorales Finales (mg)	% de Reducción en comparación con Ratones Tratados con Vehículo
Vehículo	2083	0
Bortezomib	1664	20 %
25 mg/kg de LT1009	1860	11 %
50 mg/kg de LT1009	1978	5 %
50 mg/kg de LT1009 + Bortezomib	1832	12 %

30 LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Lpath, Inc.
Sabbadini, Roger
Garland, William A.
Hansen, Genevieve
Jones, Steven Tarran

Williams, David

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA UNIÓN A ESFINGOSINA-1-FOSFATO

5 <130> LPT-3010-PC
 <150> 60/ 854.971
 <151> 27-10-2006

10 <160> 37
 <170> Patent In versión 3.4

15 <210> 1
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 1
 at ggr at gga gckggr t ct t tmt ctt 26

25 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 2
 cagt ggat ag acagatgggg g 21

35 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador

<400> 3
 cagtggatag accgat gggg c 21

45 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Cebador

<400> 4
 cagtggatag actgatgggg g 21

55 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Cebador

65 <400> 5

caagggatag acagat gggg c 21

5 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 6
 gt ct ct gat t ct agggca 18

15 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador

<400> 7
 act ggat ggt gggaagat gg 20

25 <210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

30 <400> 8

G n A l a H i s L e u G n G n S e r A s p A l a G u L e u V a l L y s P r o G l y A l a
 1 5 10 15

S e r V a l L y s I l e S e r O y s L y s V a l S e r G l y P h e I l e P h e I l e A s p H i s
 20 25 30

T h r I l e H i s T r p M e t L y s G n A r g P r o G u G n G l y L e u G u T r p I l e
 35 40 45

G l y O y s I l e S e r P r o A r g H i s A s p I l e T h r L y s T y r A s n G u M e t P h e
 50 55 60

A r g G l y L y s A l a T h r L e u T h r A l a A s p L y s S e r S e r T h r T h r A l a T y r
 65 70 75 80

I l e G n V a l A s n S e r L e u T h r P h e G u A s p S e r A l a V a l T y r P h e O y s
 85 90 95

A l a A r g G l y G l y P h e T y r G l y S e r T h r I l e T r p P h e A s p P h e T r p G l y
 100 105 110

G n G l y T h r T h r L e u T h r V a l S e r
 115 120

35 <210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

ES 2 524 059 T3

<400> 9

G u Thr Thr Val Thr G n Ser Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 G u Lys Val Thr Ile Arg Oys Ile Thr Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30
 Met Asn Trp Phe G n G n Lys Pro Gly G u Pro Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser G u Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Leu Phe Thr Ile G u Asn Met Leu Ser
 65 70 75
 G u Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Oys Leu G n Ser Asp Asn Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu G u Ile Lys
 100 105

5

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

10

<400> 10

Ile Thr Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn
 1 5 10

15

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

20

<400> 11

G u Gly Asn Ile Leu Arg Pro
 1 5

25

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

30

<400> 12

Leu G n Ser Asp Asn Leu Pro Phe Thr
 1 5

35

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

ES 2 524 059 T3

<400> 13

Asp His Thr Ile His
1 5

5 <210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

10 <400> 14

Cys Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Arg
1 5 10 15

Gly

15 <210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus sp.

20 <400> 15

Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp Phe
1 5 10

25 <210> 16
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Dominios variables del anticuerpo murino humanizado

<400> 16

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

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

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe
35 40 45

Ile Asp His Thr Ile His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Cys Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

ES 2 524 059 T3

G u Met Phe Arg Gly G n Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu G n Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
100 105 110

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

Phe Trp Gly G n Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser
145

<210> 17
<211> 134
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Dominios variables del anticuerpo murino humanizado

10

<400> 17

Met Asp Met Arg Val Pro Ala G n Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Gu Thr Thr Leu Thr G n Ser Pro Ser Phe
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr
35 40 45

Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Tyr G n G n Gu Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Lys Leu G n Pro Gu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu G n
100 105 110

Ser Asp Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly G n Gly Thr Lys Leu Gu Ile
115 120 125

Lys Arg Gu Trp Ile Pro
130

15

<210> 18
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 524 059 T3

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la CDR del mAb murino humanizado

5 <400> 18
at aaccacca ct gat at t ga t gat gat at g aac 33

<210> 19
<211> 21
10 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la CDR del mAb murino humanizado

15 <400> 19
gaaggcaat a t t ct t cgt cc t 21

<210> 20
<211> 27
20 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la CDR del mAb murino humanizado

25 <400> 20
t t gcagagt g ataacttacc attcacg 27

<210> 21
<211> 13
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la CDR del mAb murino humanizado

35 <400> 21
gacat act t cac 13

40 <210> 22
<211> 51
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la CDR del mAb murino humanizado

50 <400> 22
t gt at t t ct c ccagacat ga t at t act aaa t acaat gaga t gt t cagggg c 51

<210> 23
<211> 36
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la CDR del mAb murino humanizado

60 <400> 23
ggggggt t ct acggt agt ac t at ct ggt t t gact t t 36

<210> 24
<211> 36
65 <212> ADN
<213> Artificial

ES 2 524 059 T3

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la CDR del mAb murino humanizado

5 <400> 24
ggggggt t ct acggt agt ac t at ct ggt t t gact t t 36

10 <210> 25
<211> 455
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos del mAb murino humanizado

<400> 25

cgccaagct t	gccgccacca	t ggggt caac	cgccat cct c	gccct cct cc	t ggct gt t ct	60
ccaaggagt c	t gt t ccgagg	t gcagct ggt	gcagt ct gga	gcagaggt ga	aaaagcccgg	120
ggagt ct ct g	aagat ct cct	gt cagagt t t	t ggat acat c	t t t at cgacc	at act t cact	180
gggt gcgcca	gat gcccggg	caaggcct gg	agt ggat gt g	t at t t ct ccc	agacat gat a	240
t t act aaat a	caat gagat g	t t caggggcc	aggt caccat	ct cagccgac	aagt ccagca	300
gcaccgcct a	ct t gcagt gg	agcagcct ga	aggcct cgga	caccgccat g	t at t t ct gt g	360
cgagagggggg	gt t ct acggt	agt act at ct	ggt t t gact t	t t ggggcaa	gggacaat gg	420
t caccgt ct c	t t cagcct cc	accaagggcc	cat cg			455

20 <210> 26
<211> 452
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos del mAb murino humanizado

<400> 26

cgccaagct t	gccgccacca	t ggggt caac	cgccat cct c	gccct cct cc	t ggct gt t ct	60
ccaaggagt c	t gt t ccgagg	t gcagct ggt	gcagt ct gga	gcagaggt ga	aaaagcccgg	120
ggagt ct ct g	aagat ct cct	gt cagagt t t	t ggat acat c	gacat act t	cact ggat gc	180
gccagat gcc	cgggcaaggc	ct ggagt gga	t gggggct at	t t ct cccaga	cat gat at t a	240
ct aaat acaa	t gagat gt t c	aggggccagg	t cacat ct c	agccgacaag	t ccagcagca	300
ccgcct act t	gcagt ggagc	agcct gaagg	cct cggacac	cgccat gt at	t t ct gt gcga	360
gaggggggt t	ct acggt agt	act at ct ggt	t t gact t t t g	gggccaaggg	acaat ggt ca	420
ccgt ct ct t c	agcct ccacc	aagggccat	cg			452

30 <210> 27
<211> 147
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Secuencia del mAb murino humanizado

40 <400> 27

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 Val Oys Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Oys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45
 Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110
 Tyr Phe Oys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp
 115 120 125
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser
 145

5 <210> 28
 <211> 419
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia del mAb murino humanizado

<400> 28
 cgccaagct t gccgccacca t ggacat gag ggi ccccgct cagct cct gg ggct cct gct 60
 gct ct ggct c ccaggt gcc a gat gt gaaac gacact cacg cagt ct ccat cct t cct gt c 120
 t gcat ct gt a ggagacagag t caccat cac at aaccacca ct gat at t ga t gat gat at g 180
 aact ggt at c agcaggaacc agggaaagcc cct aagct cc t gat ct at ga aggcaat at t 240
 ct t cgt cct g ggggt cccat c aaggt t cagc ggcagt ggat ct ggcacaga t t t cact ct c 300
 accat cagca aat t gcagcc t gaagat t t t gcaact t at t act gt t t gca gagi gat aac 360
 t t accat t ca cgt t cggcca agggaccaag ct ggagat ca aacgt gagi g gat cccgcg 419

15 <210> 29
 <211> 407
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 524 059 T3

<220>

<223> Secuencia del mAb murino humanizado

5

<400> 29

```

cgccaagct t gccgccacca tggacat gag ggt ccccgct cagct cct gg ggct cct gct      60
gct ct ggct c ccaggggcca gat gt gaaac gacagt gacg cagt ct ccat cct t cct gt c    120
t gcat ct gt a ggagacagag t caccat cac t t gcat aacc accact gat a t t gat gat ga  180
t at gaact gg t t ccagcagg aaccagggaa agccct aag ct cct gat ct ccgaaggcaa    240
t at t ct t cgt cct ggggt cc cat caagat t cagcagcagt ggat at ggca cagat t t cac  300
t ct caccat c agcaaat tgc agcct gaaga t t t t gcaact t at t act gt t t gcagagt ga  360
t aact t acca t t cact t t cg gcccaagggac caagct ggag at caaac                    407
    
```

<210> 30

10

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia del mAb murino humanizado

<400> 30

```

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1          5          10          15

Gly Ala Arg Oys Gu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser
 20          25          30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Oys Ile Thr Thr Thr Asp
 35          40          45

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Gu Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 50          55          60

Leu Leu Ile Ser Gu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg
 65          70          75          80

Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Lys
 85          90          95

Leu Gln Pro Gu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Oys Leu Gln Ser Asp Asn
 100          105          110

Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gu Ile Lys
 115          120          125
    
```

20

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia del mAb murino humanizado

<400> 31

Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 32
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia del mAb murino humanizado

15

<400> 32

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45

Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110

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

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

20

<210> 33
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Secuencia del mAb murino humanizado

<400> 33

ES 2 524 059 T3

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Asp Ala Arg Cys Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Thr Asp
 35 40 45
 Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Lys Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp
 100 105 110
 Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 34
 <211> 2034
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia del mAb murino humanizado

10

<400> 34

aagct t gccg ccacat gga at ggagct gg gt gt t cct gt t ct t t ct gt c cgt gaccaca 60
 ggcgt gcat t ct gaggt gca gct ggt gcag t ct ggagcag aggt gaaaaa gcccggggag 120
 t ct ct gaaga t ct cct gi ca gagt t t t gga t acat ct t t a t cgacat ac t at t cact gg 180
 at gcgccaga t gcccgggca aggcct ggag t gga t ggggg ct at t t ct cc cagacat gat 240
 at t act aaat acaat gagat gt t caggggc cagg t cacca t ct cagccga caagt ccagc 300
 agcaccgcct act t gcagt g gagcagcct g aaggcct cgg acaccgccat gt at t t ct gt 360
 gcgagagggg ggt t ct acgg t agt act at c t ggt t t gact t t t ggggcca agggacaat g 420
 gt caccgt ct ct t cagcct c caccaagggc ccat cgg t ct t cccct ggc accct cct cc 480
 aagagcacct ct gggggcac agcggccct g ggct gcct gg t caaggact a ct t cccgaa 540
 ccgg t gacgg t gt cgt ggaa ct caggegcc ct gaccagcg gcgt gcacac ct t cccggct 600
 gt cct acagt cct caggact ct act ccct c agcagcgt gg t gaccgt gcc ct ccagcagc 660
 t t gggcacc agacct acat ct gcaacgt g aat cacaagc ccagcaacac caaggt ggac 720

ES 2 524 059 T3

aagagagt t g gt gagaggcc agcacagga gggagggt gt ct gct ggaag ccaggct cag 780
 cgct cct gcc t ggacgcat c cggct at gc agt cccagt c cagggcagca aggcaggccc 840
 cgt ct gcct c t t caccggga ggct ct gcc cgccccact c at gct caggg agagggt ct t 900
 ct ggct t t t t ccccaggct c t gggcaggca caggct aggt gcccct aacc caggccct gc 960
 acacaaaggg gcaggt gct g ggct cagacc t gccaagagc cal at ccggg aggacct gc 1020
 ccct gacct a agcccacccc aaaggccaaa ct ct ccact c cct cagct cg gacacct t ct 1080
 ct cct cccag at t ccagt aa ct cccaat ct t ct ct ct gca gagcccaat ct t gt gacaa 1140
 aact cacaca t gcccaccgt gcccagggt aa gccagcccag gcct cgccct ccagct caag 1200
 gcgggacagg t gccct agag t agcct gcat ccagggacag gccccagccg ggt gct gaca 1260
 cgt ccacct c cat ct ct t cc t cagcacct g aact cct ggg gggaccgt ca gt ct t cct ct 1320
 t cccccaaa acccaaggac accct cat ga t ct cccggac ccct gaggt c acat gcgt gg 1380
 t ggt ggacgt gagccacgaa gacct gagg t caagt t caa ct ggt acgt g gacggcgt gg 1440
 aggt gcat aa t gccaagaca aagccgaggg aggagcagt a caacagcagc t accgt gt gg 1500
 t cagcgt cct caccgt cct g caccaggact ggct gaat gg caaggagt ac aagt gcaagg 1560
 t ct ccaacaa agccct ccca gccccat cg agaaaacct ct ccaaagcc aaaggt ggga 1620
 cccgt ggggt gcgagggcca cat ggacaga ggccggct cg gcccacct c t gccct gaga 1680
 gt gaccgct g t accaacct c t gt ccct aca gggcagcccc gagaaccaca ggt gt acacc 1740
 ct gccccat cccgggagga gat gaccaag aaccagggt ca gcct gacct g cct ggt caaa 1800
 ggct t ct at c ccagcgacat cgccgt ggag t gggagagca at gggcagcc ggagaacaac 1860
 t acaagacca cgct cccgt gct ggact cc gacggct cct t ct t cct ct a t agcaagct c 1920
 accgt ggaca agagcaggt g gcagcagggg aacgt ct t ct cal gct ccgt gat gcat gag 1980
 gct ct gcaca accact acac gcagaagagc ct ct ccct gt ct ccgggt aa at ag 2034

<210> 35
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia del mAb murino humanizado

10

<400> 35

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Oys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45
 Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

ES 2 524 059 T3

G u Trp Met G y Al a Ile Ser Pro Arg H i s Asp Ile Thr Lys Tyr Asn
 65 70 75 80
 G u Met Phe Arg G y G n Val Thr Ile Ser Al a Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Al a Tyr Leu G n Trp Ser Ser Leu Lys Al a Ser Asp Thr Al a Met
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Al a Arg G y G y Phe Tyr G y Ser Thr Ile Trp Phe Asp
 115 120 125
 Phe Trp G y G n G y Thr Met Val Thr Val Ser Ser Al a Ser Thr Lys
 130 135 140
 G y Pro Ser Val Phe Pro Leu Al a Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser G y
 145 150 155 160
 G y Thr Al a Al a Leu G y Oys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro G u Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser G y Al a Leu Thr Ser G y Val H i s Thr
 180 185 190
 Phe Pro Al a Val Leu G n Ser Ser G y Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu G y Thr G n Thr Tyr Ile Oys Asn
 210 215 220
 Val Asn H i s Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Al a Pro
 225 230 235 240
 G u Leu Leu G y G y Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro G u Val Thr Oys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser H i s G u Asp Pro G u Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 G y Val G u Val H i s Asn Al a Lys Thr Lys Pro Arg G u G u G n Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu H i s G n Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn G y Lys G u Tyr Lys Oys Lys Val Ser Asn Lys Al a Leu
 325 330 335

ES 2 524 059 T3

Pro Ala Pro Ile Gu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Gu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Gu Gu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Gu Trp Gu Ser Asn Gly Gln Pro Gu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Gu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 36
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia del mAb murino humanizado

10

<400> 36

aagct t gccg ccaccat gt c t gt gcc t acc cagg t gct gg gact gct gct gct gt ggct g 60
 acagacgccc gct gt gaaac gacagt gacg cagt ct ccat cct t cct gt c t gcat ct gt a 120
 ggagacagag t caccat cac t t gcat aacc accact gat a t t gat gat ga t at gaact gg 180
 t t ccagcagg aaccaggaa agccct aag ct cct gat ct ccgaaggcaa t at t ct t cgt 240
 cct ggggt cc cat caagat t cagcagcagt ggat at ggca cagat t t cac t ct caccat c 300
 agcaaat t gc agcct gaaga t t t t gcaact t at t act gt t t gcagagt ga t aact t acca 360
 t t cact t t cg gccaaaggac caagct ggag at caaacgt a cggt ggct gc accat ct gt c 420
 t t cat ct t cc cgccat ct ga t gagcagt t g aaat ct ggaa ct gcc t ct gt t gt gt gcc t g 480
 ct gaat aact t ct at ccag agaggccaaa gt acagt gga aggt ggat aa cgccct ccaa 540
 t cgggt aact cccaggagag t gt cacagag caggacagca aggacagcac ct acagcct c 600
 agcagcacc t gacgt gag caaagcagac t acgagaaac acaaagt ct a cgct gcgaa 660
 gt caccat c agggcct gag ct cgccct c acaaagagct t caacagggg agagt gt t ag 720

15

<210> 37
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 524 059 T3

<220>

<223> Secuencia del mAb murino humanizado

<400> 37

5

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

Asp Ala Arg Cys Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Thr Asp
35 40 45

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Lys Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp
100 105 110

Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado que se une a esfingosina-1-fosfato (S1P) en condiciones fisiológicas, en el que:

a. el anticuerpo comprende dos polipéptidos de cadena ligera y dos polipéptidos de cadena pesada, en el que:

5 (i) cada polipéptido de cadena ligera comprende la primera, segunda, y tercera regiones que determinan la complementariedad CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, en el que CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos ITTTDIDDDMN (SEC ID N°: 10); CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos EGNILRP (SEC ID N°: 11); y CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos LQSDNLPFT (SEC ID N°: 12); y

10 (ii) cada polipéptido de cadena pesada comprende la primera, segunda, y tercera regiones que determinan la complementariedad CDRH1, CDRH2, y CDRH3, respectivamente, en el que CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos DHTIH (SEC ID N°: 13); CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos AISPRHDITKYNEMFRG (SEC ID N°: 31); y CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos GGFYGSTIWDFD (SEC ID N°: 15); y

15 b. el fragmento de anticuerpo tiene un solo sitio de unión a antígeno y comprende un polipéptido de cadena ligera o fragmento del mismo y un polipéptido de cadena pesada o fragmento del mismo, en el que:

(i) el polipéptido de cadena ligera o fragmento del mismo comprende la primera, segunda, y tercera regiones que determinan la complementariedad CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, en el que CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos ITTTDIDDDMN (SEC ID N°: 10); CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos EGNILRP (SEC ID N°: 11); y CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos LQSDNLPFT (SEC ID N°: 12); y

20 (ii) el polipéptido de cadena pesada o fragmento del mismo comprende la primera, segunda, y tercera regiones que determinan la complementariedad CDRH1, CDRH2, y CDRH3, respectivamente, en el que CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos DHTIH (SEC ID N°: 13); CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos AISPRHDITKYNEMFRG (SEC ID N°: 31); y CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos GGFYGSTIWDFD (SEC ID N°: 15),

25 en el que las tres CDR de cadena ligera se injertan en una región marco de cadena ligera humana que contiene las tres mutaciones siguientes en la secuencia de murino: Y49S, G64S, y S67Y, y en el que las tres CDR de cadena pesada se injertan en una región marco de cadena pesada humana que contiene la mutación siguiente en la secuencia V37M de murino, en el que la región marco de cadena ligera es de anticuerpo AY050707 humano y la región marco de cadena pesada humana es de anticuerpo AJ002773 humano.

2. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

35 a. la cadena o cadenas pesadas o fragmento de las mismas del anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprenden un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSFQYIFIDHTIHWMRQMPGQGLEWM
 GAISPRHDITYNEMFRGQVTISADKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYFCAR
 GGFYGSTIWFD
 FWGQGTMTVSS;

y

40 (ii) una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 % con la secuencia de aminoácidos de a(i), mencionada anteriormente; y

b. la cadena o cadenas ligeras o fragmento de las mismas del anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i)

ETTVTQSPSFLSASVGDRTITCITTTDIDDDMNWFQQEPG
 KAPKLLISEGNILRPGVPSRFSSSGYGTDFTLTISKLQPEDF
 ATYYCLQSDNLPFTFGQG
 TKLEIK;

45

y

(ii) una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 % con la secuencia de aminoácidos de b(i), mencionada anteriormente.

3. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humanizado aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

5 a. la cadena o cadenas pesadas del anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSFQYIFIDHTIHWMRQMPGQGLE
 WMGAISPRHDITKYNEMFRGQVTISADKSSSTAYLQWSSLKASDTAMYF
 CARGGFYGSTIWFDWFGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKS
 LSLSPGK ,

10 en la que el resto de K (lisina) C-terminal es opcional; y

(ii) una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 % con la secuencia de aminoácidos de a(i), mencionada anteriormente; y

15 b. la cadena o cadenas ligeras del anticuerpo o fragmento de anticuerpos comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i)

ETTVTQSPSFLSASVGDRTITCITTTDIDDDMNWFQQEPGKAPKL
 LISEGNILRPGVPSRFSSSGYGTDFLTISKLPEDFATYYCLQSDNLPFTFG
 QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC ;

y

20 (ii) una secuencia de restos de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 % con la secuencia de aminoácidos de b(i), mencionada anteriormente.

4. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo madurado por afinidad.

5. Un fragmento de anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre el grupo que consiste en un fragmento de Fv, un fragmento de Fv de una sola cadena, un fragmento de Fab, y un fragmento de Fab'.

25 6. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

a. el dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia codificada por el gen de cadena pesada en el vector pATH1009 en StB12 de *E. coli*, depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° de Acceso de la ATCC PTA-8421, y el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia codificada por el gen de cadena ligera en el vector pATH1009 en StB12 de *E. coli*, depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° de

- Acceso de la ATCC PTA-8421; o
- b. el dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia codificada por la cadena pesada en el vector pATH1009 en la línea celular de CHO LH1 275, depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° de Acceso de la ATCC PTA-8422; y
- 5 el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia codificada por la cadena ligera en el vector pATH1009 en la línea celular de CHO LH1 275, depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° de Acceso de la ATCC PTA- 8422,
7. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo contiene un sitio de glicosilación.
- 10 8. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un artículo que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 envasado en un recipiente, y que además comprende opcionalmente instrucciones de uso.
- 15 10. Una composición de ácido nucleico aislado que codifica la expresión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición comprende:
- a. un primer casete de expresión que comprende un promotor y un gen que codifica el polipéptido o polipéptidos de cadena pesada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y
- b. un segundo casete de expresión que comprende un promotor y un gen que codifica el polipéptido polipéptidos de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 20 11. Una composición de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la composición comprende un plásmido que comprende el primer y segundo casetes de expresión.
12. Una célula huésped recombinante transfectada con una composición de ácido nucleico aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-11 y que es capaz de expresar dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 25 13. Un procedimiento de producción de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende el cultivo de una célula huésped recombinante capaz de producir el anticuerpo en un medio de cultivo celular y aislar el anticuerpo.
14. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto, en el que dicha enfermedad trastorno se correlaciona con un nivel anómalo de S1P.
- 30 15. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 en la que la enfermedad o trastorno se caracteriza, al menos en parte, por neovascularización, angiogénesis, proliferación de células endoteliales, fibrogénesis, fibrosis, cicatrización, inflamación, o respuesta inmune anómalas.

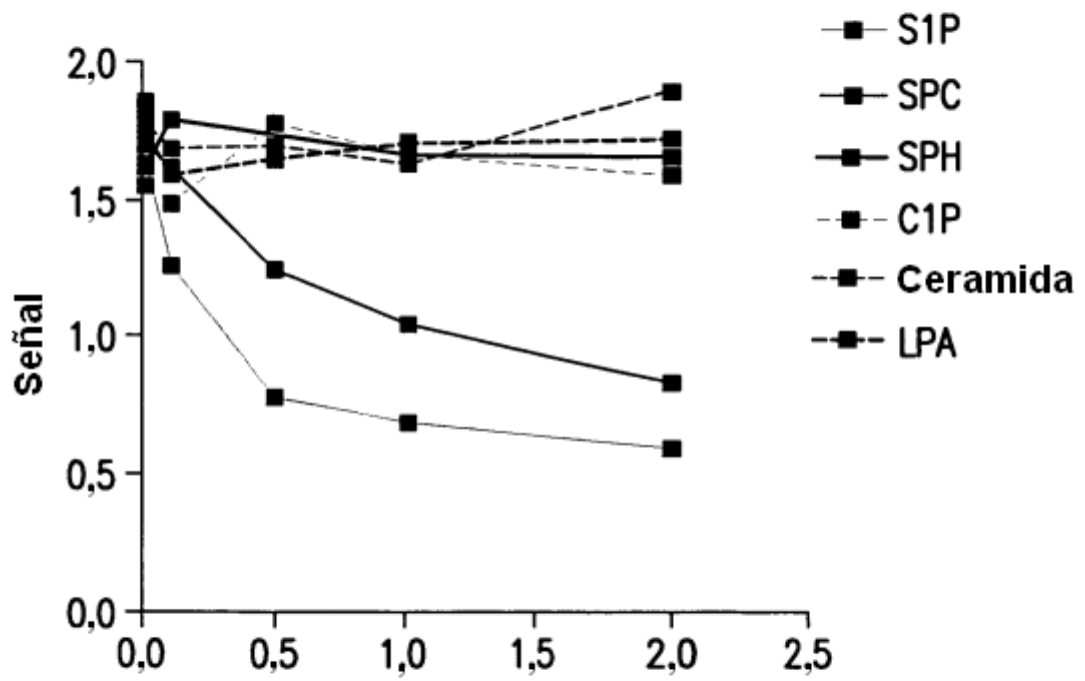


FIG.1A

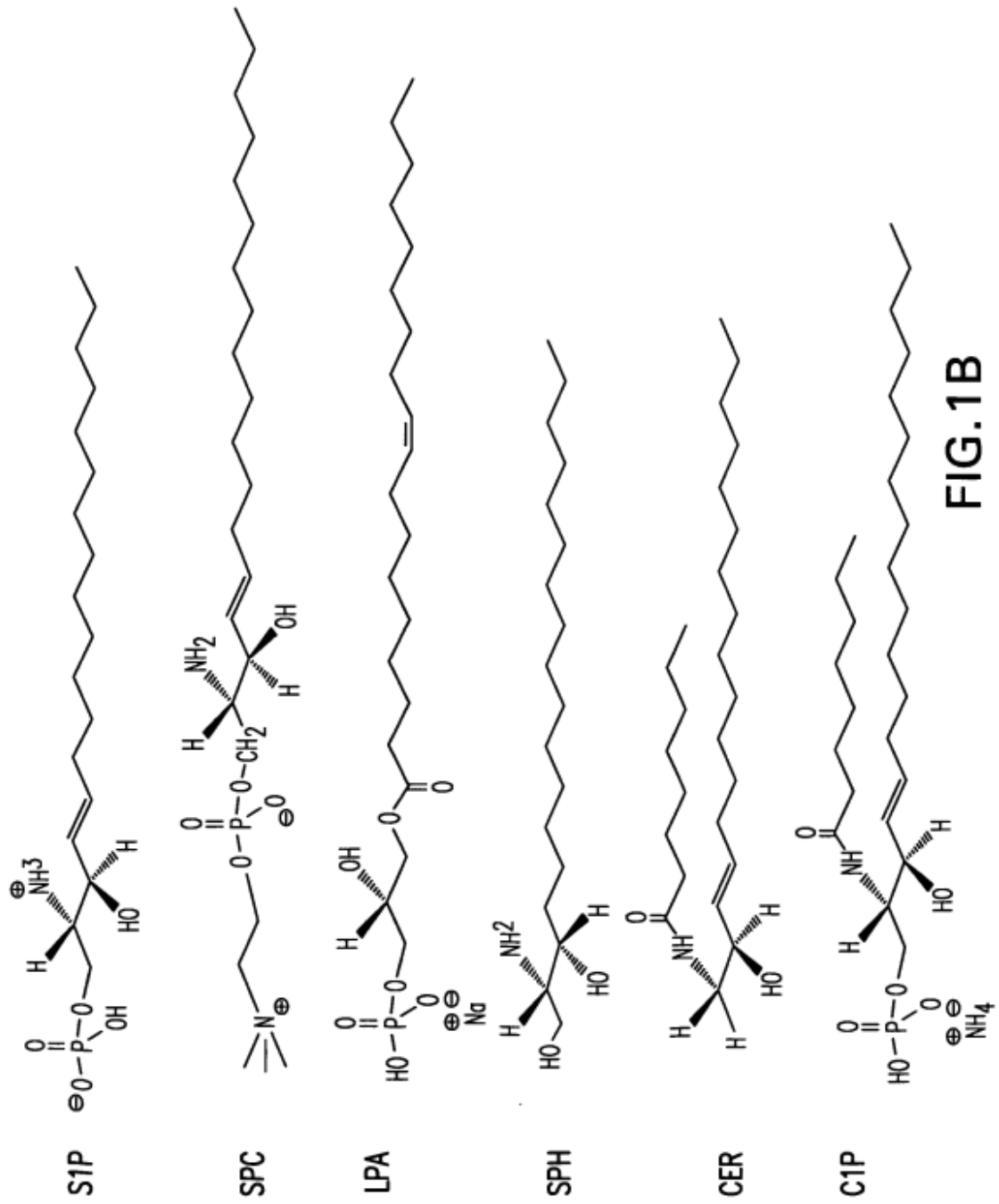


FIG.1B

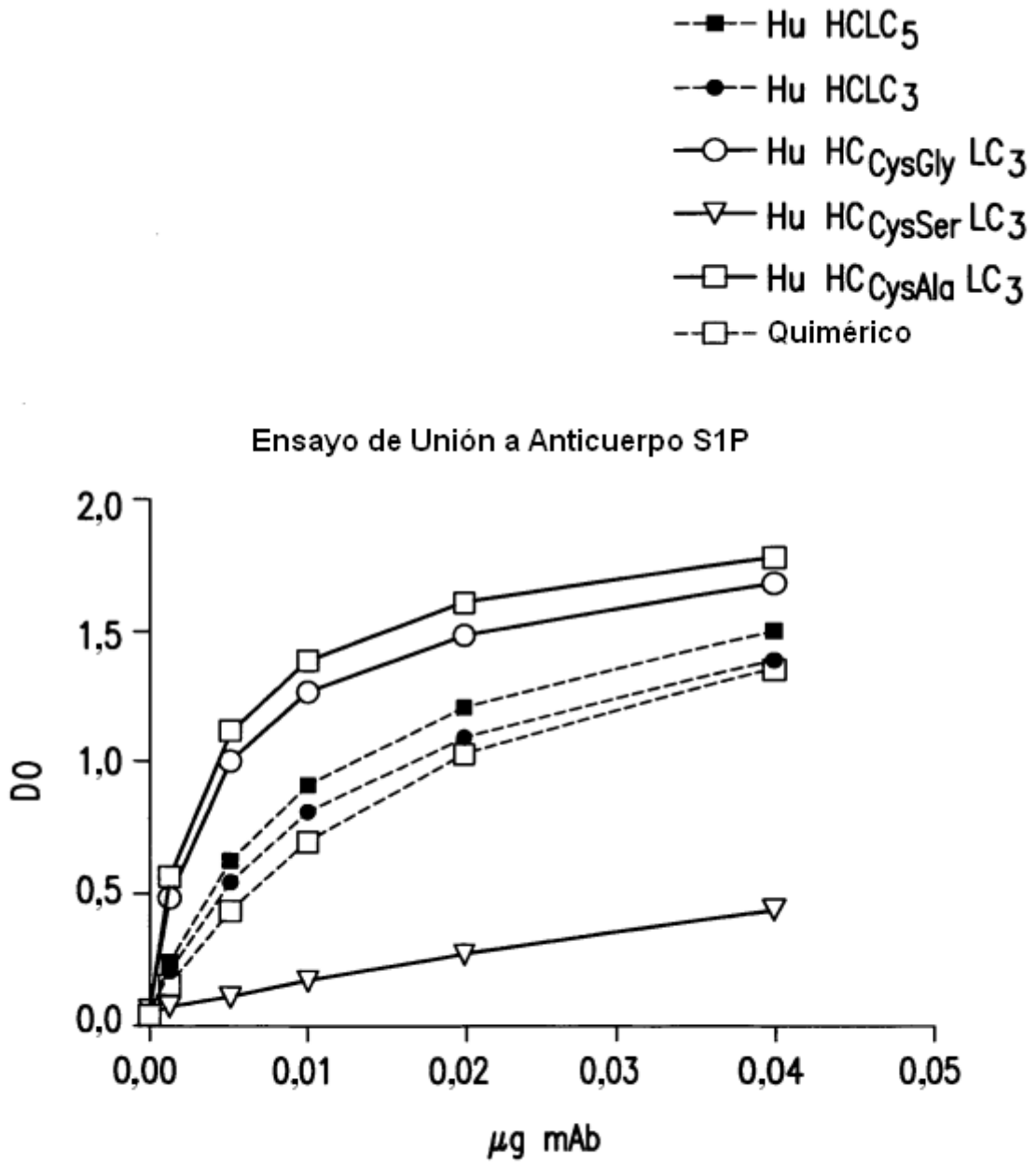


FIG.2

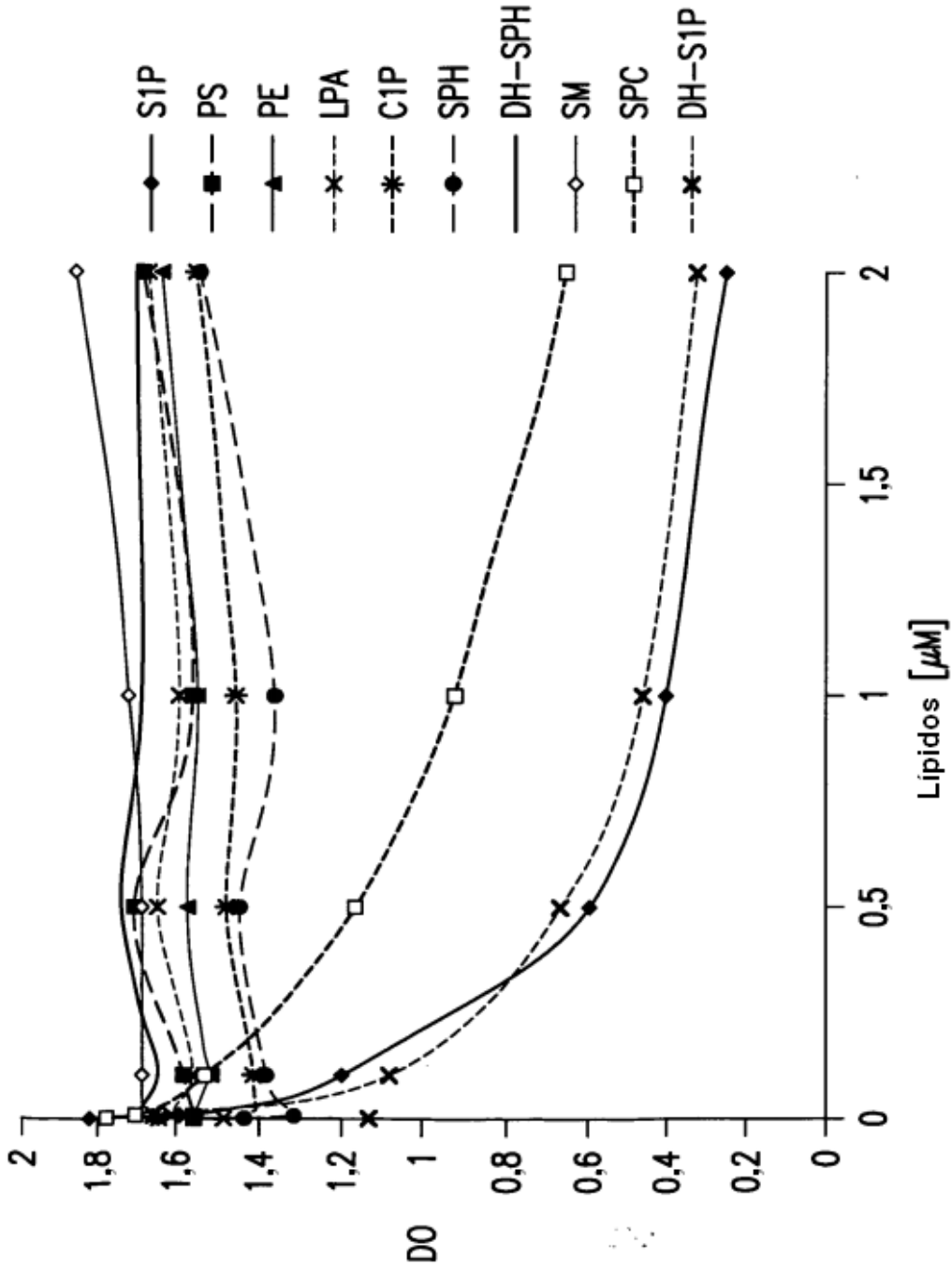


FIG.3

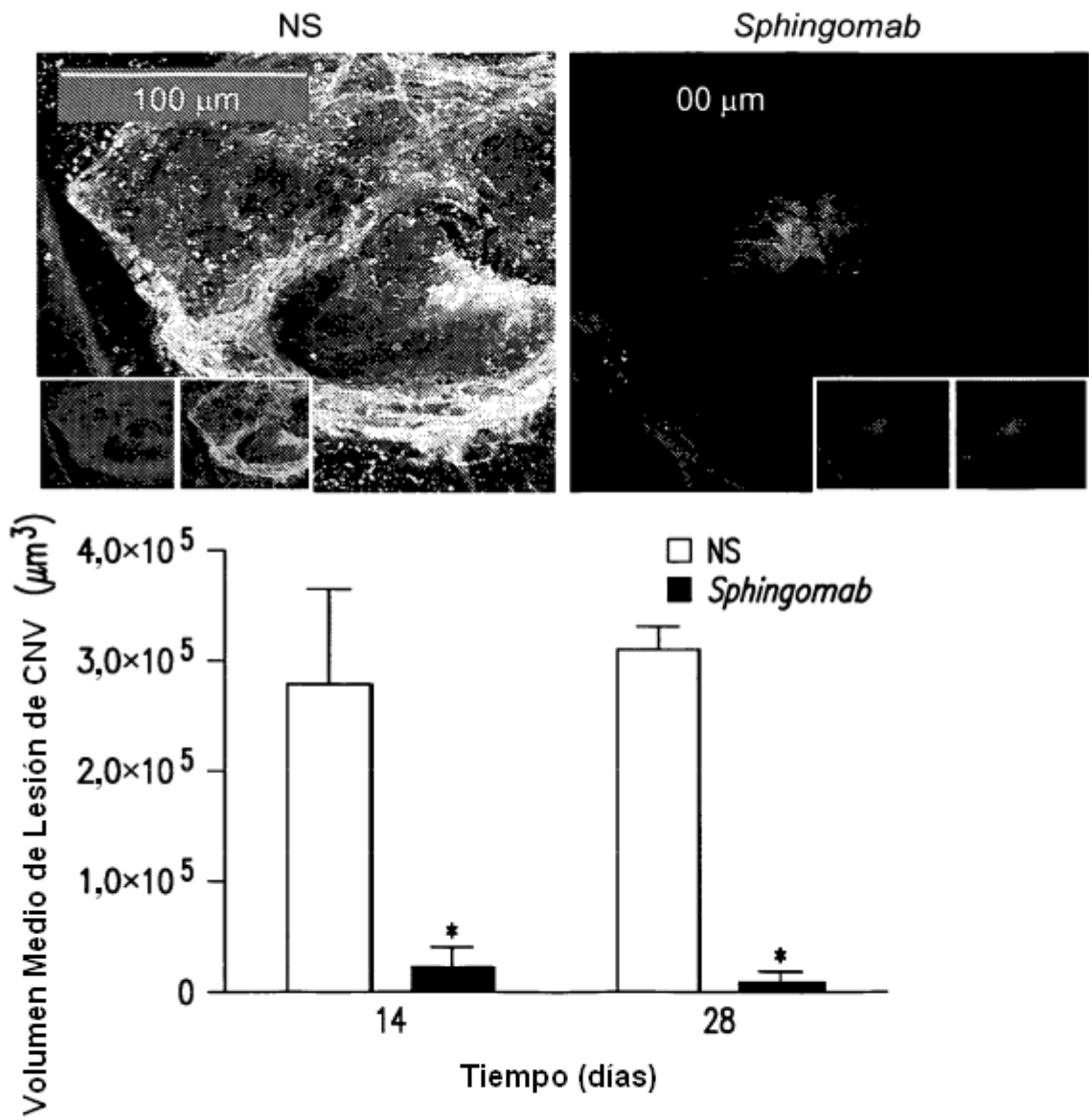


FIG.4A

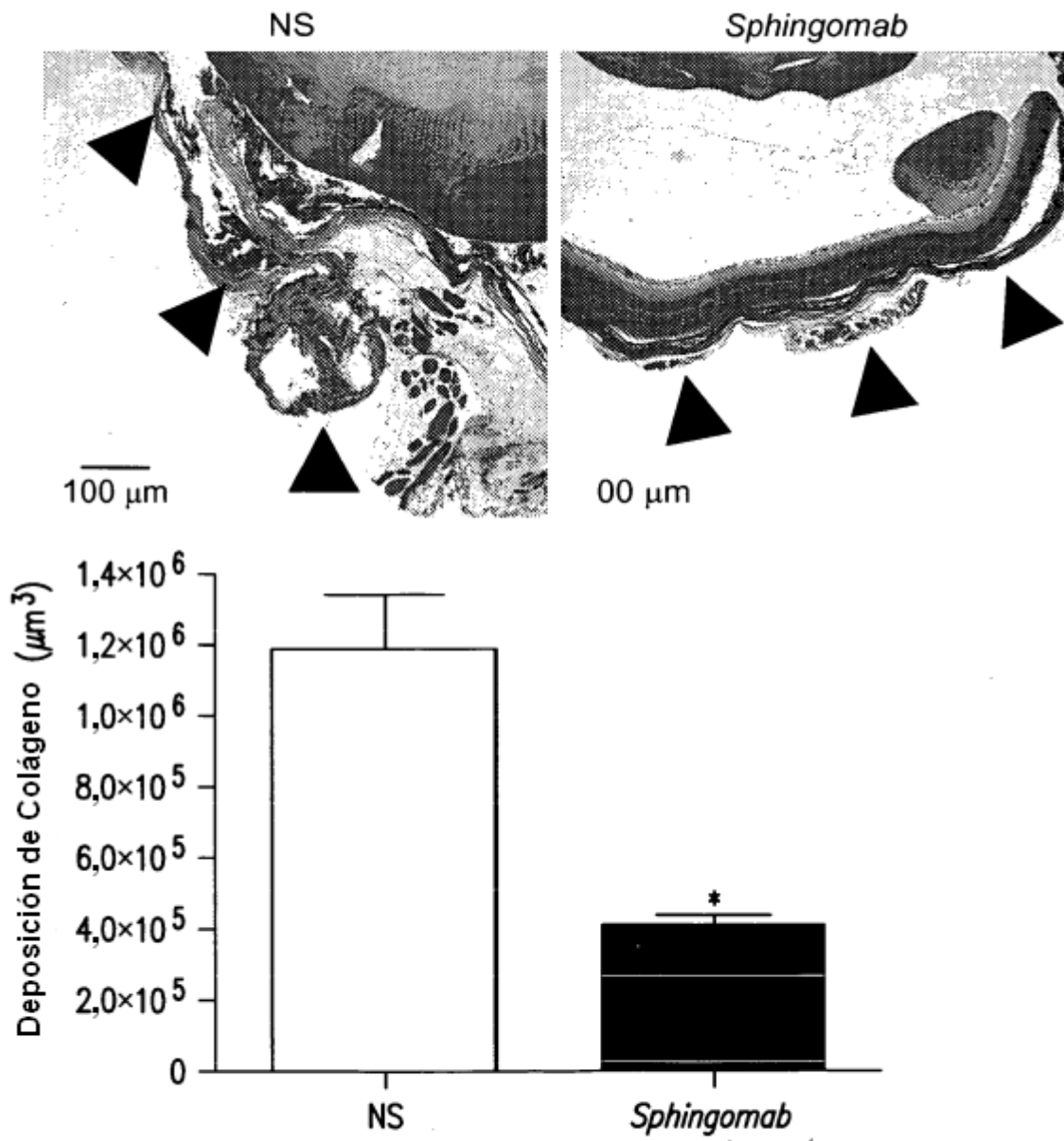


FIG.4B

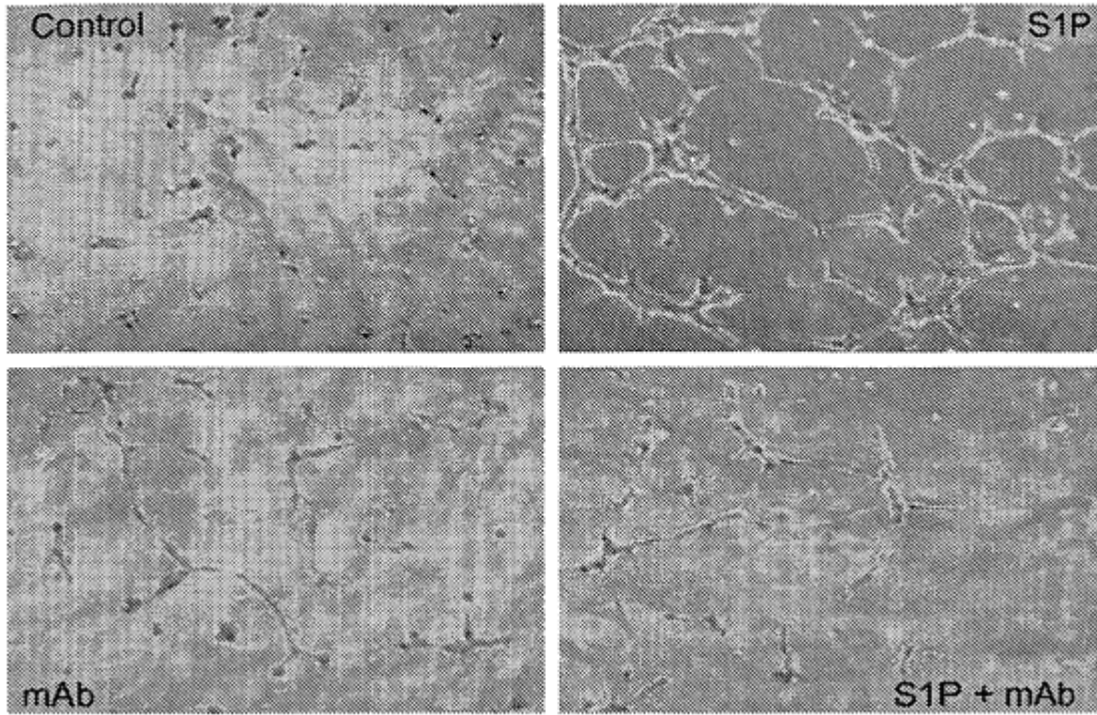


FIG.5A

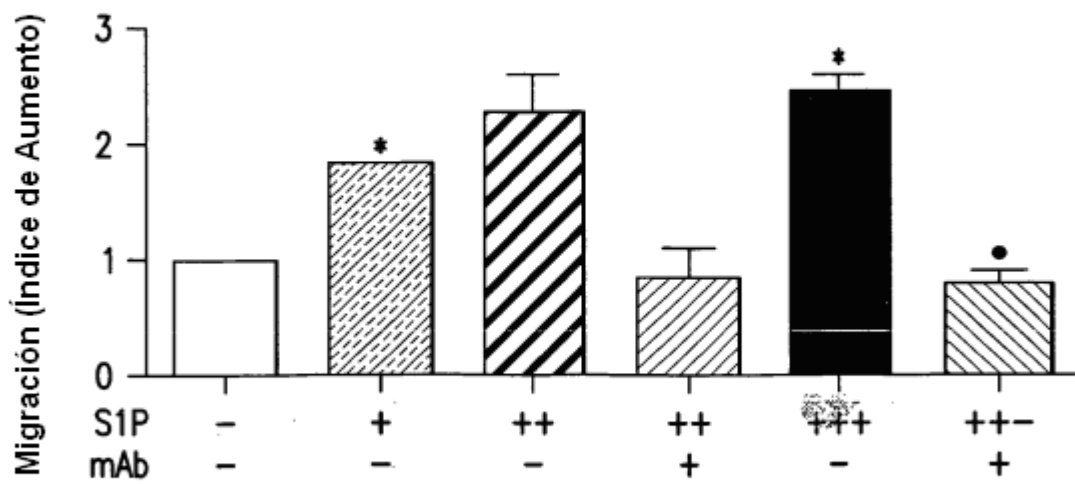


FIG.5B

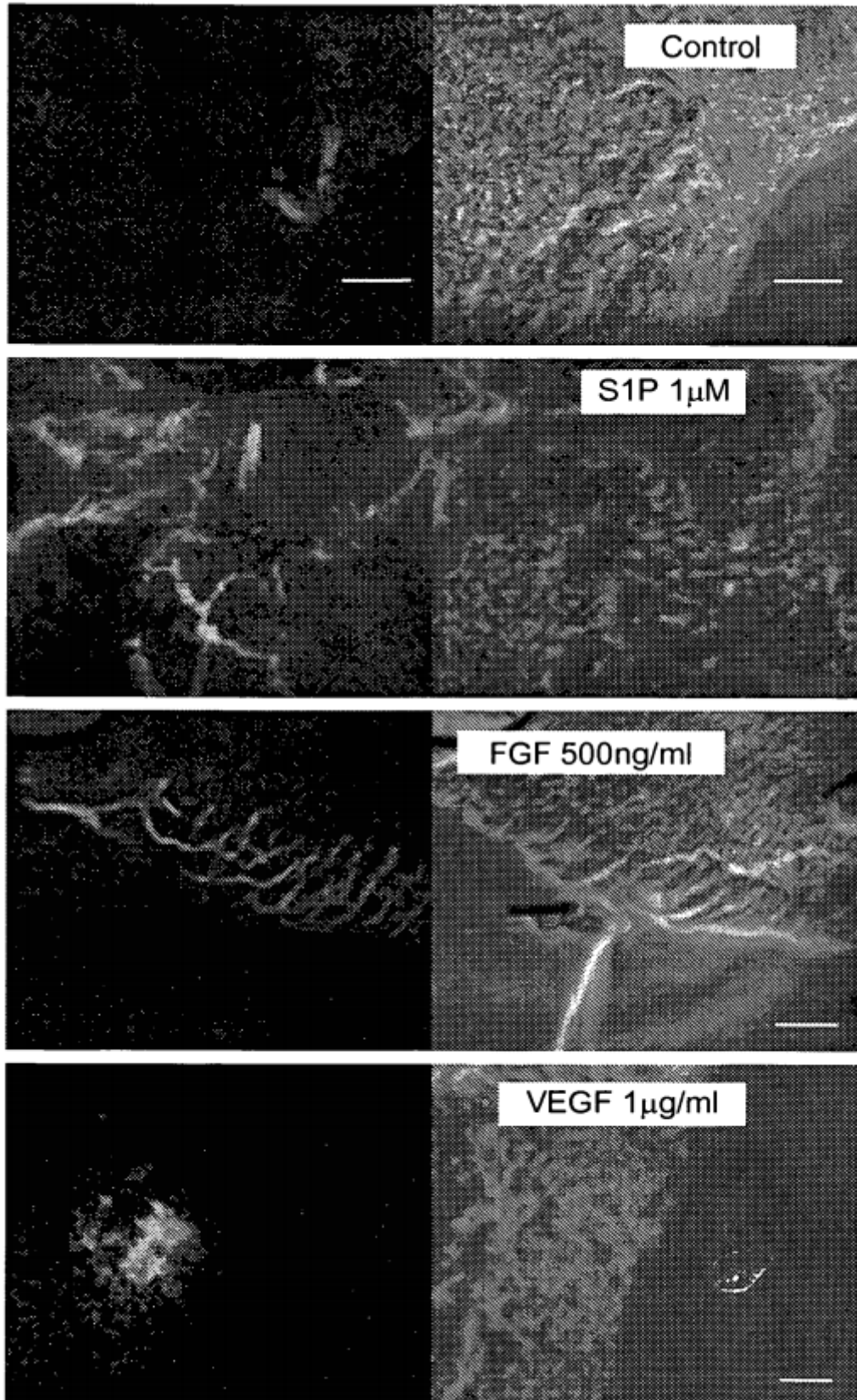


FIG.6A

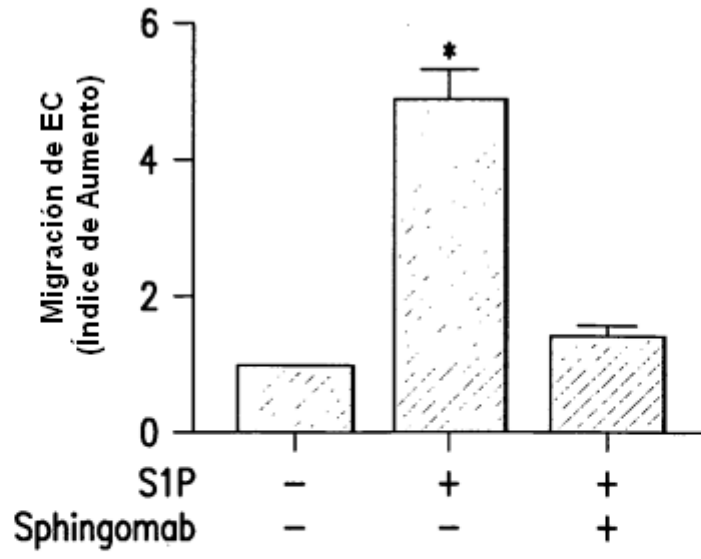


FIG.6B

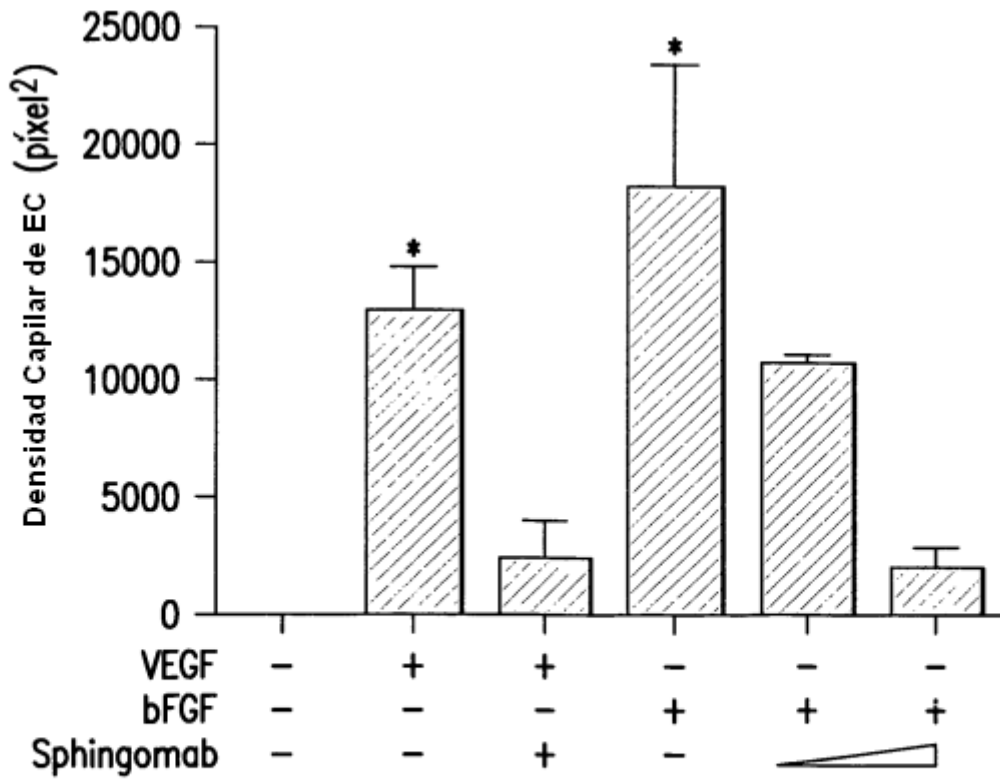


FIG.6C

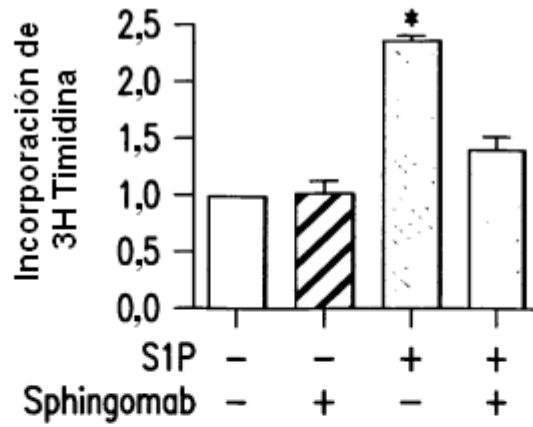


FIG.7A

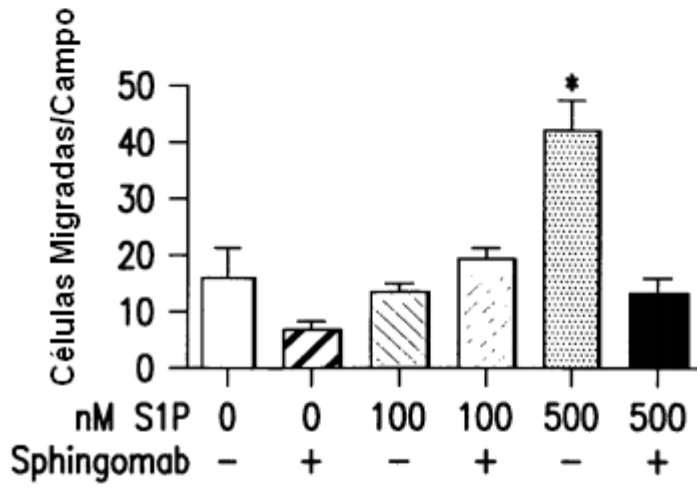


FIG.7B

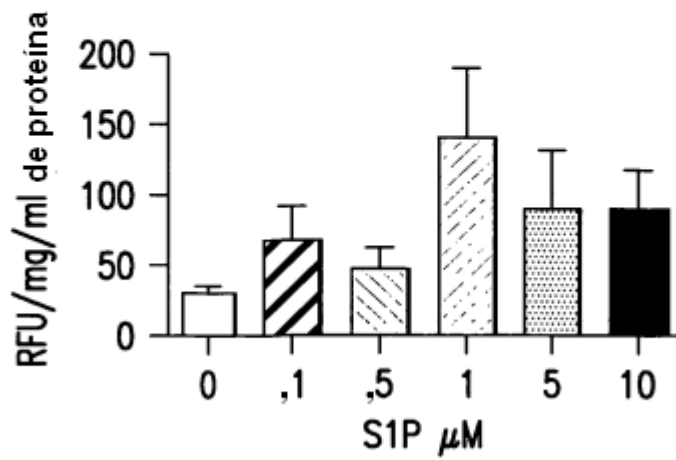


FIG.7C

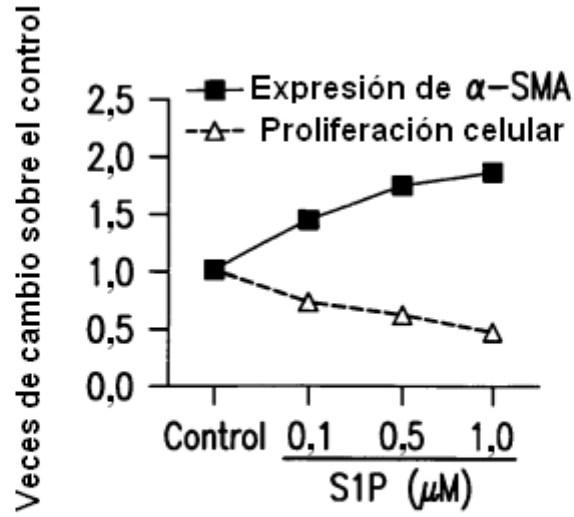


FIG. 7D

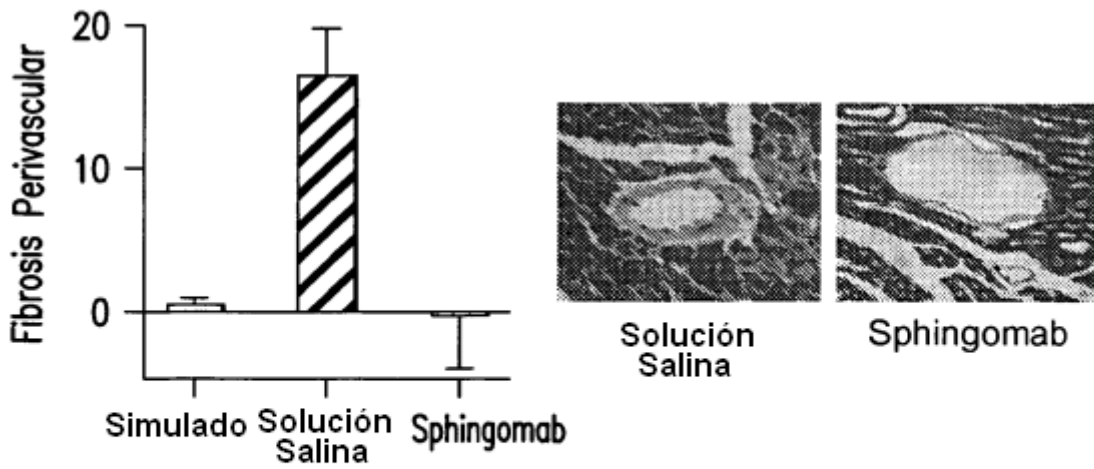


FIG. 7E

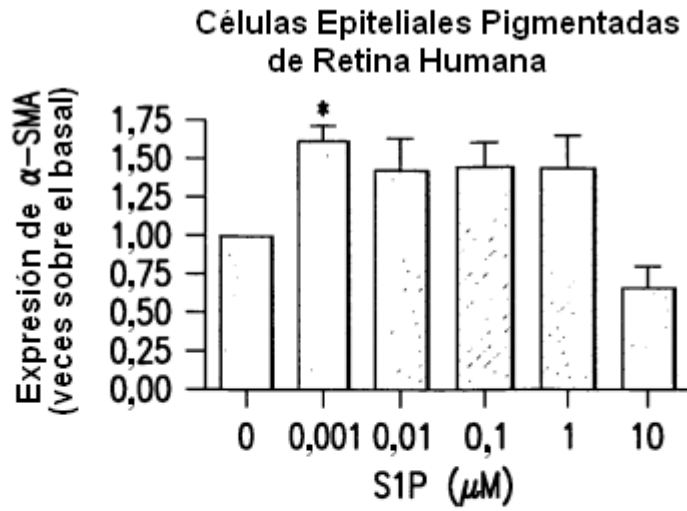


FIG.8A

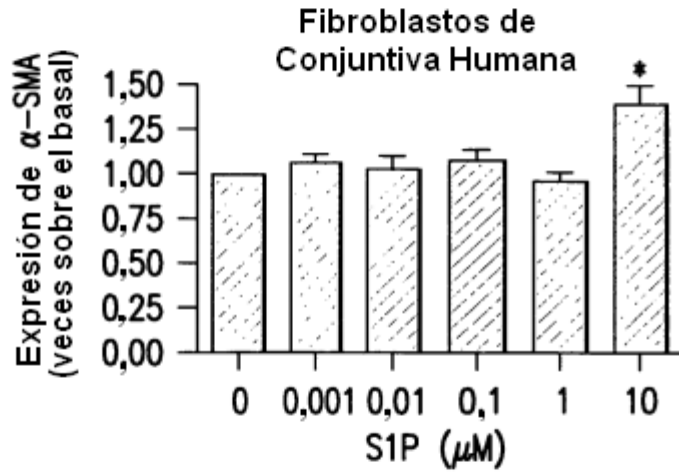


FIG.8B

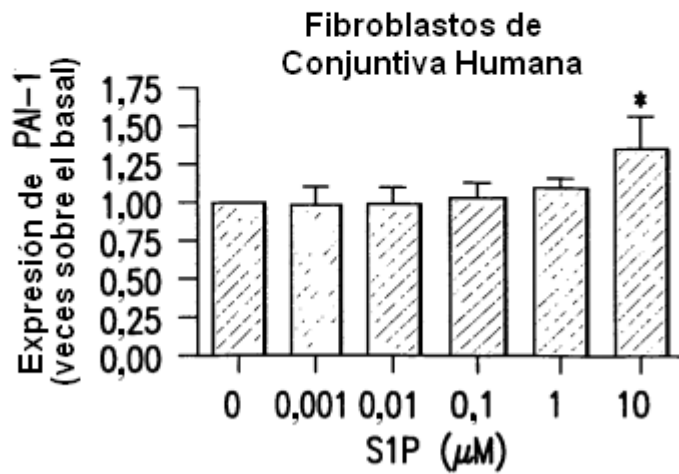


FIG.8C

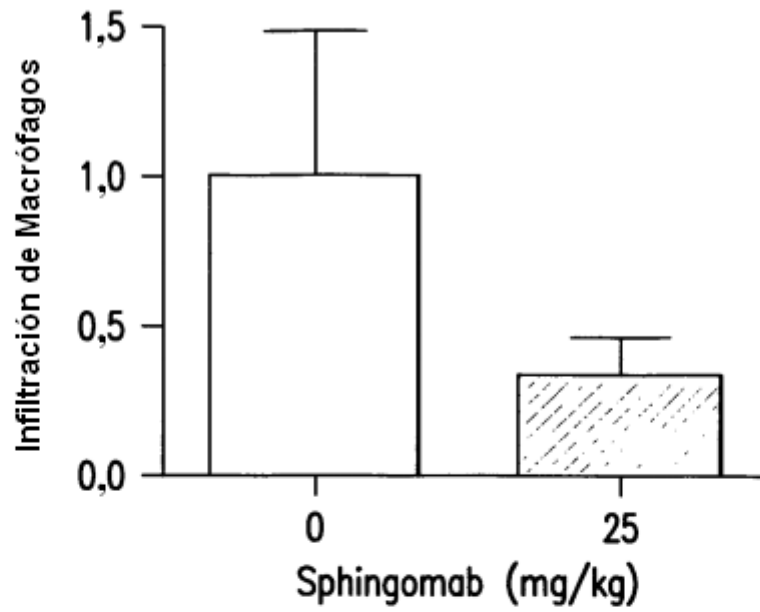


FIG.9A

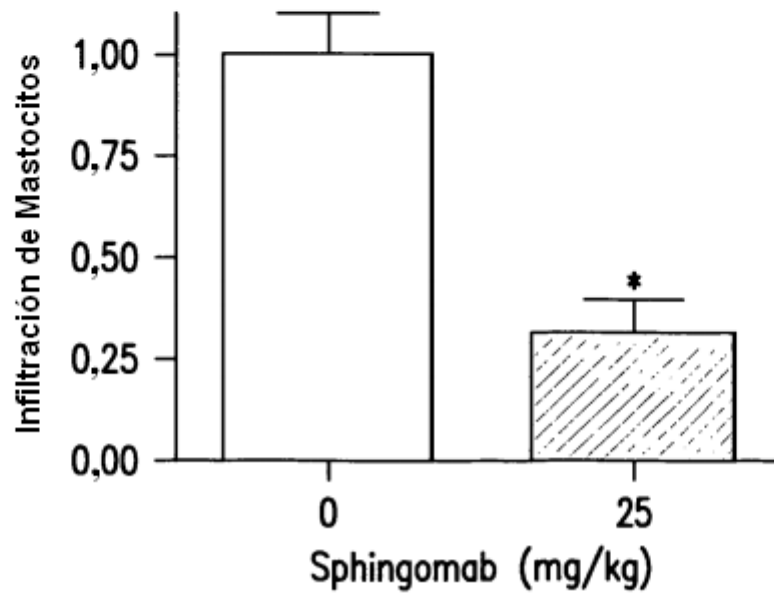


FIG.9B

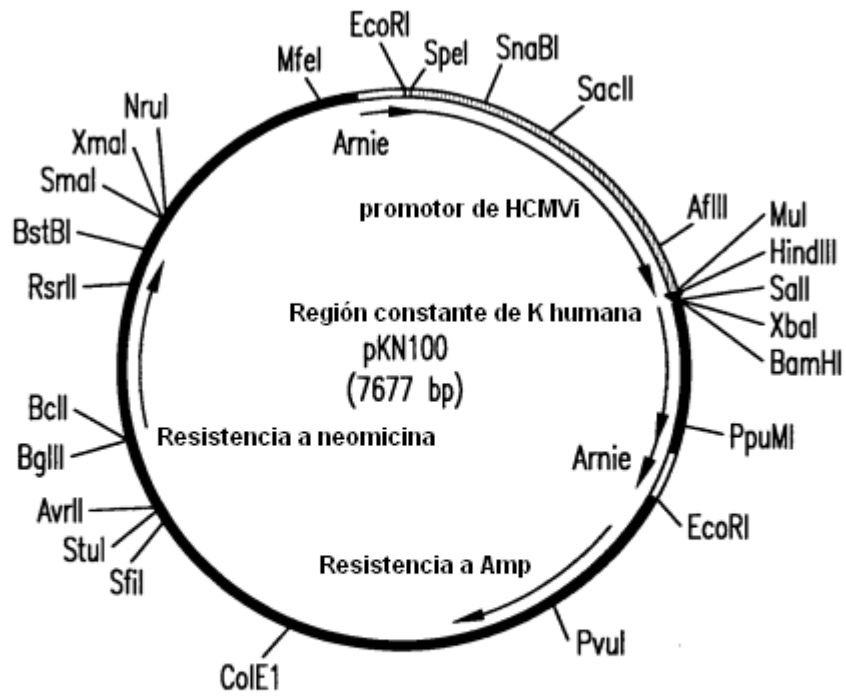


FIG.10A

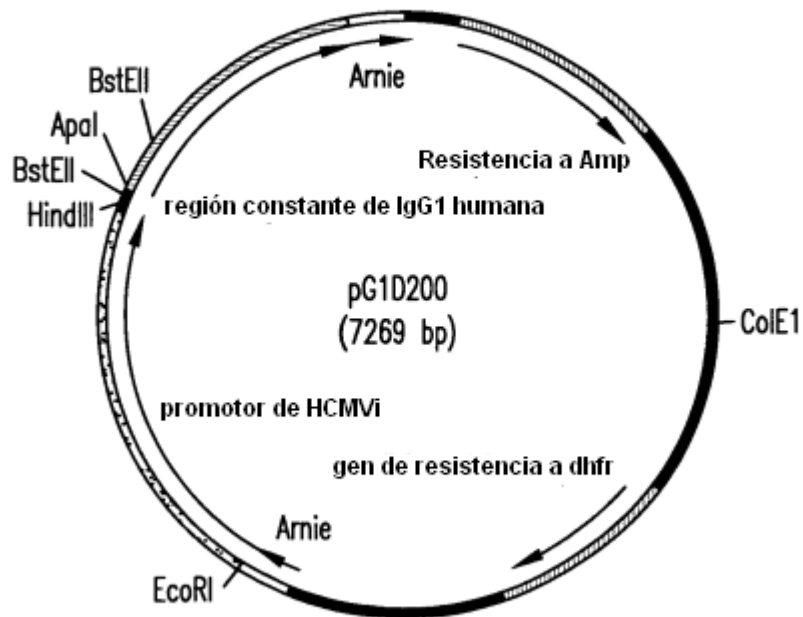


FIG.10B

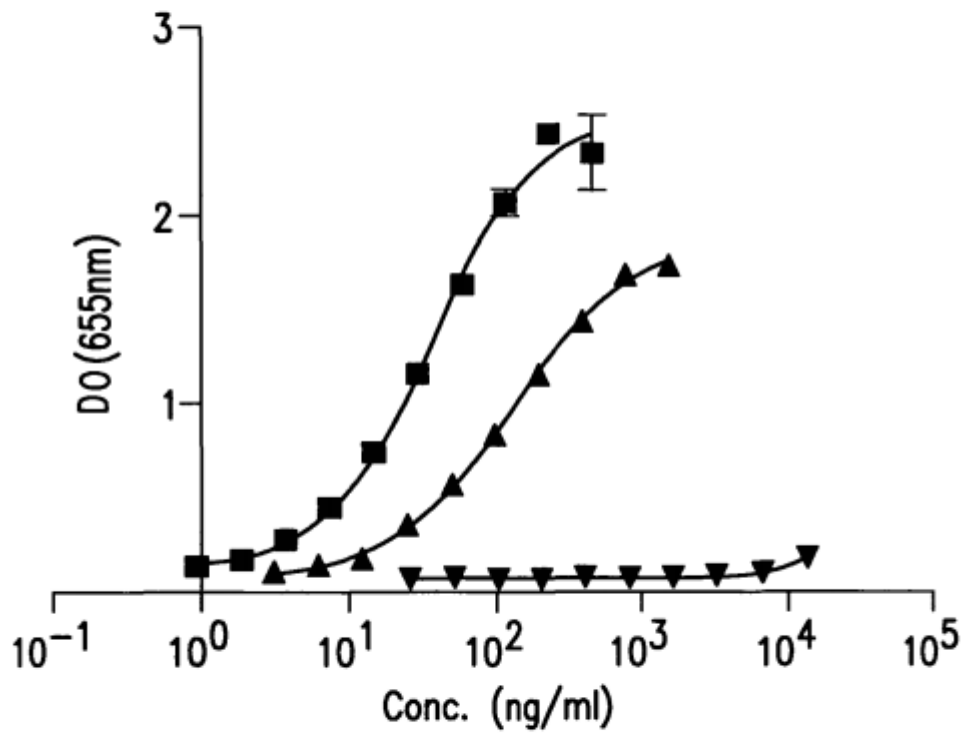


FIG. 11

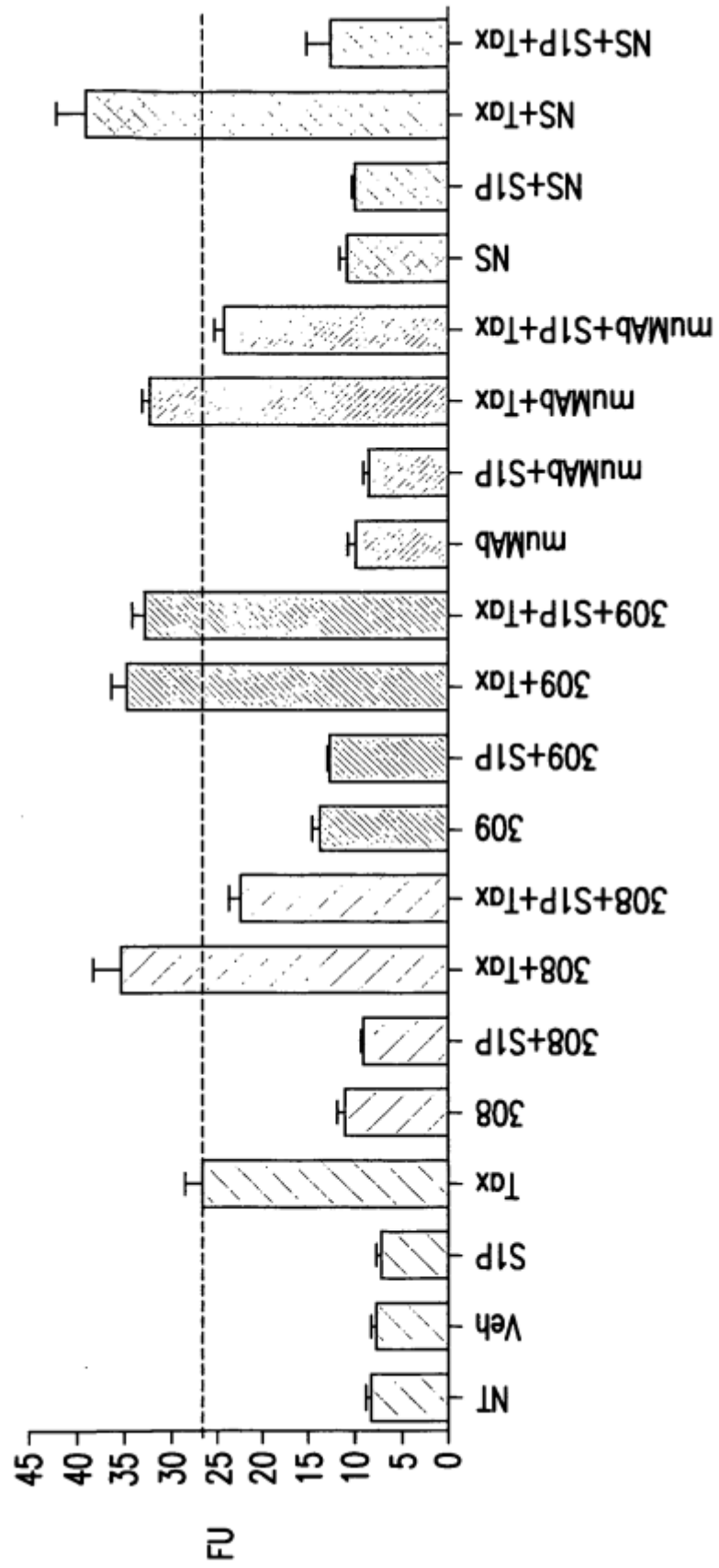


FIG.12A

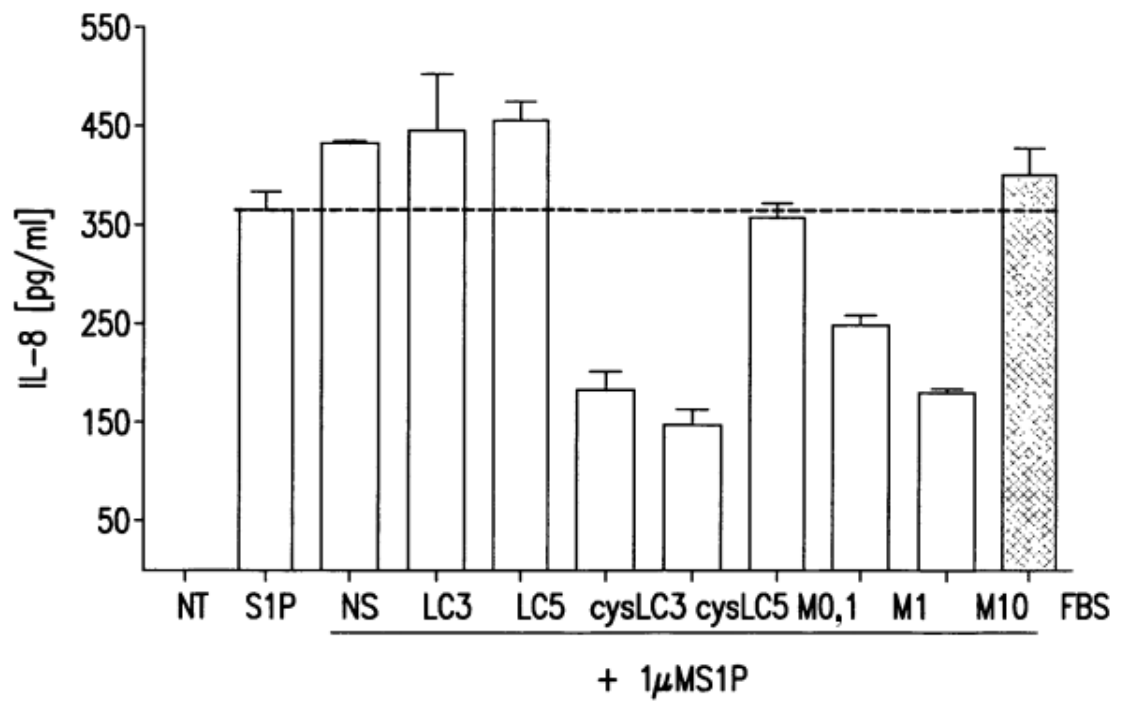


FIG. 12B

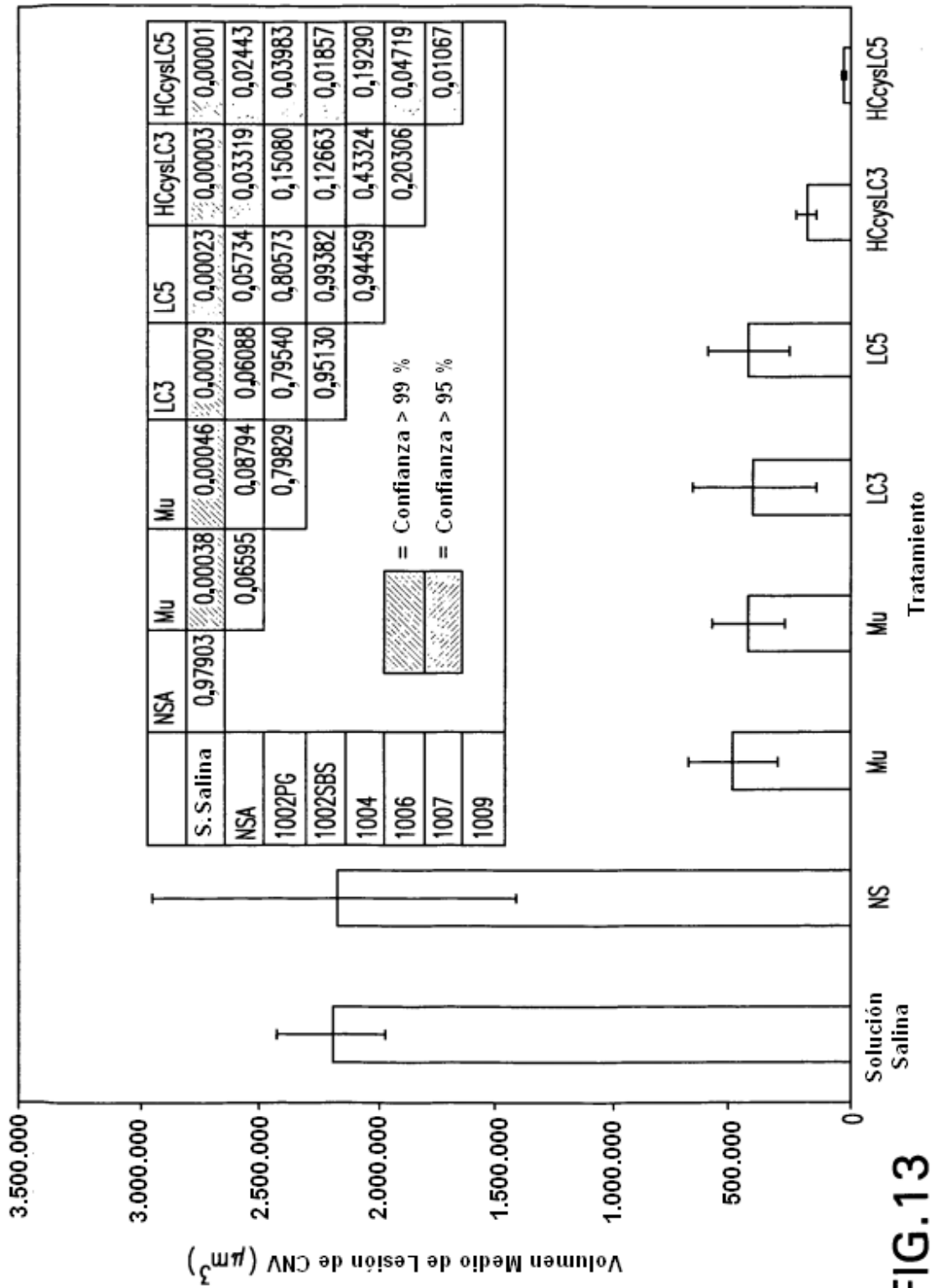


FIG.13