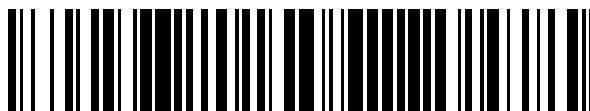


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 877**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2008 E 08799283 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2324060**

54 Título: **Anticuerpo antiglucoesfingolípido de tipo I extendido, derivados del mismo y utilización**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2015**

73 Titular/es:

**GLYCONEX INC. (100.0%)**  
**11F, No. 31, Lane 169 Kang-Ning Street, Hsi-Chih District**  
**22180 New Tapei City, TW**

72 Inventor/es:

**CHANG, TONG-HSUAN;**  
**TING, JERRY;**  
**HONG, TSAI-HSIA;**  
**YANG, MEI-CHUN;**  
**LIU, LIAHNG-YIRN;**  
**CHANG, SHU-YEN;**  
**CHEN, YING-JIN;**  
**WEN, JAW-YUAN;**  
**HANDA, KAZUKO y**  
**HAKOMORI, SEN-ITIROH**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 549 877 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

Anticuerpo antiglucoesfingolípido de tipo I extendido, derivados del mismo y utilización.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos antiglucoesfingolípido de tipo I extendido, y a su utilización en la mejora, el tratamiento o la prevención de enfermedades o trastornos en mamíferos, incluyendo seres humanos, que resultan de la actividad o metabolismo inadecuado del mismo; que resultan, que causan o que están asociados con; o la presencia del mismo, por ejemplo, en un cáncer, tal como cáncer colorrectal u otra patología. Un anticuerpo de interés puede usarse para fines terapéuticos o fines de diagnóstico. De esta manera, se describen también composiciones profilácticas, inmunoterapéuticas y de diagnóstico que comprenden los anticuerpos y derivados de los mismos de interés, y su utilización en métodos para prevenir o tratar o diagnosticar enfermedades en mamíferos, incluyendo seres humanos, causadas por metabolismo y/o expresión inadecuados del glucoesfingolípido de tipo I extendido en y sobre células, tales como ciertas células malignas.

**Antecedentes**

El glucoesfingolípido de tipo I extendido es una molécula de la superficie celular que puede estar asociado con, por ejemplo, ciertos estados malignos.

Se ha apreciado que la glucosilación aberrante es una característica común de muchos tipos de cáncer; Hakomori, PNAS 99: 10231-10233, 2002. Algunos de los antígenos de hidratos de carbono usados para el diagnóstico de cánceres humanos poseen estructuras de polilactosamina. Las polilactosaminas se clasifican usualmente en dos categorías de acuerdo con la estructura unitaria. Una polilactosamina que tiene la estructura Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3G1cNAc se denomina una cadena de tipo I, y aquella que tiene la estructura Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4G1cNAc es referida como una cadena de tipo II. Los antígenos más comunes asociados a tumores encontrados en algunos cánceres humanos tienen la estructura de cadena de tipo II de la serie lacto, la cual está usualmente sialilada y/o fucosilada. Los antígenos de cadena de tipo I son abundantes en células y tejidos normales, y ocasionalmente están asociados con cáncer; Stroud et al., JBC 266: 8439-8446, 1991. Por ejemplo, el antígeno Le<sup>a</sup> sialilado 2- $\rightarrow$ 3 (el antígeno CA 19-9 definido por el anticuerpo N19-9) es un antígeno de cadena tipo I asociado con cáncer. Sin embargo, los métodos de diagnóstico del cáncer basados en la detección de aquellos antígenos de tipo I se han visto dificultados por las altas incidencias de falsos positivos y/o altas incidencias de falsos negativos; véase, por ejemplo, las patentes US n<sup>o</sup> 6.083.929 y n<sup>o</sup> 6.294.523.

Se produjeron dos anticuerpos monoclonales de ratón, NCC-ST421 e IMH2, contra antígenos de cadena de tipo I extendida. NCC-ST421 es específico de Le<sup>a</sup>-Le<sup>a</sup>. El anticuerpo NCC-ST421 indujo fuertemente citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) usando leucocitos de sangre periférica humana como efectores contra una variedad de células tumorales humanas, e indujo citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) con una fuente de complemento humana; Watanabe et al., Cáncer Res. 51: 2199-2204, 1991. Se descubrió que el antígeno Le<sup>a</sup>-Le<sup>a</sup> está muy expresado en la línea de células de carcinoma de colon humano, Colo205.

El IMH2 también se estableció contra cadenas de tipo I extendidas. El IMH2 se unió a Le<sup>b</sup>-Le<sup>a</sup>, Le<sup>y</sup>-Le<sup>x</sup>, Le<sup>b</sup> y Le<sup>y</sup>, basado en RMN <sup>1</sup>H, FAB-MS y estudios de degradación enzimática; Stroud et al., Eur. J. Biochem. 203: 577-586, 1992. El IMH2 mostró fuerte destrucción activada por linfocitos, así como destrucción dependiente del complemento, de células Colo205 *in vitro*, e inhibió el crecimiento de Colo205 *in vivo*.

El IMH2 reaccionó con tejidos de carcinoma derivados de colon, páncreas, hígado y endometrio. Sin embargo, el colon normal no mostró reactividad con IMH2. El hígado y el páncreas normales mostraron reactividad débil o altamente restringida en hepatocitos e islotes de células de Langerhans normales. La intensidad de la tinción inmunológica fue mucho más fuerte en carcinomas endometriales que en endometrio normal; Ito et al., Cáncer Res. 52: 3739-3745, 1992.

Tanto NCC-ST421 como IMH2 exhiben inhibición del crecimiento tumoral en ratones atímicos tras la inoculación de células tumorales humanas que expresan el antígeno de cadena de tipo I extendida, pero no ocurrió inhibición del crecimiento en células tumorales que no expresaron el antígeno de cadena de tipo I extendida.

Debido a la abundancia de estructuras de tipo I en células normales, el uso de anticuerpos de tipo I para fines de diagnóstico y/o terapéuticos no fue hasta ahora posible.

Los tratamientos convencionales del cáncer, tales como la quimioterapia y la radioterapia, han mostrado algunas ventajas en diversos pacientes con cáncer. A pesar de los beneficios de la actividad antitumoral en las terapias convencionales, sin embargo, la toxicidad inducida por el tratamiento hacia los tejidos normales puede reducir sustancialmente la calidad de vida en los pacientes con cáncer. La intensificación de la dosis para mejor actividad antitumoral está también limitada. Los anticuerpos monoclonales permiten la promesa de citotoxicidad dirigida, enfocándose en tejidos tumorales, pero no en tejidos normales.

Pueden desarrollarse anticuerpos monoclonales (mAb) con alta especificidad por antígenos expresados en células tumorales, y pueden inducir actividades antitumorales deseadas. La promesa de los mAb fue favorecida por el desarrollo de ratones que producen mAb completamente humanos. Una de dichas herramientas es el ratón KM; patente US nº 7.041.870 y documento Tomizuka et al., Nat. Genet. 16: 133-143, 1997. En el ratón KM, los genes de ratón que codifican para inmunoglobulinas fueron inactivados y reemplazados por genes de anticuerpos humanos. De esta manera, el ratón KM expresa anticuerpos completamente humanos.

Varios anticuerpos completamente humanos se han desarrollado exitosamente usando el ratón KM.

Por ejemplo, Motoki et al. desarrollaron una IgG humana (KMTR2) que dirigió la oligomerización de TRAIL-R2 dependiente del anticuerpo e inició la señalización apoptótica y la regresión tumoral eficientes independientes de la función efectora del hospedante (Clin. Cáncer Res. 11(8): 3126-3135, 2005; y véase la patente US nº 7.115.717 e Imakire et al., Int. J. Cáncer 108: 564-570, 2004). HD8, un anticuerpo monoclonal completamente humano específico para el antígeno DR de leucocitos humanos (HLA-DR), ejerció citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), así como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) in vitro, y extendió la duración de vida de los ratones inmunocomprometidos inoculados con líneas de células de linfoma no de Hodgkin; Tawara et al., Cáncer Sci. 98 (6) 921-928, 2007.

Además, se dieron a conocer dos IgM humanas producidas en ratones KM y dirigidas hacia antígenos de hidrato de carbono. HMMC-1 reconoce específicamente una estructura de O-glucano novedosa, reacciona positivamente con los carcinomas relacionados con los conductos mulerianos, y exhibe citotoxicidad dependiente del complemento en una línea de células de cáncer endometrial uterino humano, SNG-S; Nozawa et al., Clin Cáncer Res. 10: 7071-7078, 2004. Otra IgM monoclonal humana, HMOCC-1, que reconoce una glucoproteína localizada en la membrana celular, reaccionó con el cáncer de ovario (Suzuki et al., Gynecol. Oncol. 95: 290-298, 2004). Puesto que estos dos anticuerpos son moléculas de IgM, la aplicación de esos anticuerpos en la terapia del cáncer debe estar limitada por el tamaño de la molécula y restricciones en producción. El documento WO 96/254361 A1 describe anticuerpos humanizados muy específicos dirigidos contra el antígeno b de Lewis, y métodos para detectar y tratar cáncer usando anticuerpo específico contra el antígeno b de Lewis. La patente US nº 5.168.043 describe un método para determinar el estado secretor de un individuo, que comprende obtener una muestra de un fluido biológico del individuo y determinar si la muestra incluye los antígenos Le<sup>a</sup> o Le<sup>b</sup>, indicando la presencia del antígeno Le<sup>a</sup> en la muestra que el individuo no es secretor, indicando la presencia del antígeno Le<sup>b</sup> en la muestra que el individuo es secretor, e indicando la ausencia de cualquiera de los antígenos que el estado secretor del individuo no es concluyente. Kubushiro Kaneyuki et al. describe un anticuerpo monoclonal anticáncer endometrial uterino (MSN-1) que reconoce el antígeno Le<sup>b</sup> ("Expression Mechanism of Human Uterine Endometrial Cancer-Specific Fucosylated Carbohydrate Chain", International Journal of Oncology, 1995, 6, p. 93-97). Henry Stephen M et al. investigan la expresión del antígeno de Lewis en el intestino delgado, y se describen varios anticuerpos dirigidos contra Le<sup>a</sup> y/o Le<sup>b</sup> ("Immunochemical and Immunohistological Expression of Lewis Histo-blood Group Antigens in Small Intestine Including Individuals of the Le(a+b+) and Le(a-b-) Nonsecretor Phenotypes", Glycoconjugate Journal, 1994(11): 600-607). Madjd Zahra et al. describen mAb SC101 que es un anticuerpo de unión a Ley/b. ("High Expression of Lewis y/b Antigen is Associated with Decreased Survival in Lymph Node Negative Breast Carcinomas", Breast Cancer Research). Stroud M R et al. describen el antígeno de glucoesfingolípido de cadena de tipo 1 extendido y varios anticuerpos ("Extended Type I Chain Glycosphingolipid Antigens Isolation and Characterization of Trifucosyl-Le<sup>b</sup> Antigen", Eur. J. Biochem, 1992, 203, p. 577-586. La patente US nº 6.294.523 describe mAb IMH2 que está dirigido contra el antígeno Le<sup>b</sup>/Le<sup>a</sup>.

## Sumario

La presente invención proporciona anticuerpos humanos novedosos, y fragmentos y derivados de los mismos, que se unen específicamente al glucoesfingolípido de tipo I extendido.

La invención incluye las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera variable de los anticuerpos y sus secuencias de ácidos nucleicos correspondientes.

Otra forma de realización de la invención incluye las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos de interés, para obtener moléculas de unión que comprenden una o más regiones CDR, o regiones derivadas de CDR, que retienen la capacidad de unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido de la molécula precursora de la cual se obtuvieron las CDR.

Otra forma de realización de la presente invención incluye las líneas de células y vectores que alojan las secuencias de anticuerpos de la presente invención.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere a la utilización de los anticuerpos para la preparación de un medicamento o composición para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la función, el metabolismo y la expresión del glucoesfingolípido de tipo I extendido.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere al uso de los anticuerpos en el diagnóstico de trastornos asociados con la biología y la expresión atípica o anormal del glucoesfingolípido de tipo I extendido.

Estos y otros objetivos se cubrieron en el desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos contra antígenos de hidrato de carbono de cadena de tipo I extendida. Por ejemplo, el mAb GNX-8 es una IgG1 humana derivada de un ratón KM. GNX-8 exhibe actividad de CDC y ADCC en varias líneas de células de cáncer colorrectal humano, e inhibe el crecimiento tumoral de Colo205 y DLD-1 in vivo. GNX-8 reacciona con los cánceres colorrectales metastásicos y primarios, cánceres de mama, cánceres de páncreas, así como cánceres de pulmón, pero no con células sanguíneas y tejidos humanos normales.

Otras características y ventajas se describen en la presente memoria, y serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

### Descripción detallada de la invención

La invención no se limita a la metodología, protocolos, polipéptidos, polinucleótidos, líneas de células, vectores o reactivos particulares descritos en la presente memoria, debido a que pueden ocurrir variaciones o pueden usarse sin que se aparten del espíritu y alcance de la invención. Además, la terminología usada en la presente memoria es con el fin de ejemplificar sólo formas de realización particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención. A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usado en la presente memoria tienen los mismos significados que aprecian comúnmente los expertos en la materia en el campo de la invención. Cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria puede usarse en la puesta en práctica de la presente invención, y solo se describen en la presente memoria métodos, dispositivos y materiales ejemplificativos.

Una "enfermedad por glucoesfingolípido de tipo I extendido" es una dolencia, trastorno, enfermedad, patología, afección, anomalía, etc., que se caracteriza por, está asociado con, o es causado por el metabolismo anormal, la sobreexpresión o los niveles incrementados del glucoesfingolípido de tipo I extendido, por ejemplo, en la superficie de la célula.

La frase "sustancialmente idéntica" con respecto a una secuencia polipeptídica del anticuerpo puede considerarse como una cadena de anticuerpo que exhibe por lo menos 70%, 80%, 90%, 95% o más de identidad de secuencia con una secuencia polipeptídica de referencia. La expresión, con respecto a una secuencia de ácido nucleico, puede considerarse como una secuencia de nucleótidos que exhibe por lo menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 97% o más de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de referencia.

Los términos "identidad" u "homología" pueden significar el porcentaje de bases de nucleótidos o restos de aminoácidos en la secuencia candidata que es idéntico con los restos de una secuencia correspondiente con la cual se compara la secuencia candidata, después de que se alinean las secuencias y se introducen espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad para toda la secuencia, y no considerando sustitución conservativa alguna como parte de la identidad de secuencia. Ni las inserciones ni los alargamientos N-terminales o C-terminales deben considerarse que reducen la identidad u homología. Los métodos y programas de ordenador para la alineación de las secuencias están disponibles y son bien conocidos en la técnica. La identidad de secuencia puede medirse usando un software de análisis de la secuencia.

Las frases y términos "fragmento, variante, derivado o análogo funcional", y similares, así como formas de los mismos, de un anticuerpo, ácido nucleico o antígeno, corresponden a un compuesto o molécula que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo o antígeno de longitud completa de interés. Por ejemplo, un fragmento o análogo funcional de un anticuerpo antiglucoesfingolípido de tipo I extendido es aquel que puede unirse a una molécula de glucoesfingolípido de tipo I extendido, o es un anticuerpo agonista o antagonista que se une al glucoesfingolípido de tipo I extendido. Un ejemplo es una molécula scFv. En cuanto al glucoesfingolípido de tipo I extendido, una variante o derivado del mismo es una molécula que no es idéntica a un glucoesfingolípido de tipo I extendido de origen natural y sin embargo puede usarse para un fin de la presente invención, tal como, aunque no es idéntico a un glucoesfingolípido de tipo I extendido de tipo salvaje, puede usarse no obstante, por ejemplo, como inmunógeno para producir anticuerpos que se unen selectivamente al glucoesfingolípido de tipo I extendido de tipo salvaje.

Las variantes "sustitucionales" son aquellas que presentan eliminado y sustituido al menos un resto de aminoácido en una secuencia nativa por un aminoácido diferente insertado en su lugar en la misma posición. Las sustituciones pueden ser individuales, en las que solo se sustituye un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, en las que dos o más aminoácidos están sustituidos en la misma molécula. Las sustituciones plurales pueden ser en sitios consecutivos. Asimismo, un aminoácido puede ser sustituido con restos plurales, en cuyo caso dicha variante comprende tanto una sustitución como una inserción.

Las variantes "insercionales" son aquellas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en una secuencia nativa. Inmediatamente adyacente a un aminoácido

significa conectado al grupo funcional  $\alpha$ -carboxilo o  $\alpha$ -amino del aminoácido.

Las variantes “delecionales” son aquellas con uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos nativa eliminados. Ordinariamente, las variantes delecionales tendrán uno o dos aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula.

Los términos variantes de sustitución, inserción y supresión se aplican también análogamente a ácidos nucleicos.

La respuesta inmunitaria adaptativa presenta dos brazos principales: la respuesta inmunitaria celular de linfocitos T y la respuesta inmunitaria humoral de linfocitos B que segregan anticuerpos. Los epítomos de células B pueden ser aminoácidos contiguos lineales, o pueden ser conformacionales (Protein Science (2005) 14, 246). Por el contrario, los epítomos de células T son péptidos lineales cortos que se escinden de proteínas antigénicas que se presentan en el contexto de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o, en el caso de seres humanos, moléculas de clase I o clase II del antígeno de leucocitos humanos (HLA). La presentación del epítomo depende tanto de las interacciones del receptor de células T (TCR) como de la unión entre el MHC y el péptido. Las proteínas del MHC son altamente polimórficas, y cada una se une a una serie limitada de péptidos. De esta manera, la combinación particular de alelos del MHC presentes en un hospedante limita la gama de epítomos potenciales reconocidos durante una infección.

Dos tipos fundamentales de células T se distinguen por la expresión de proteínas CD8 y CD4, que determina si una célula T reconocerá a los epítomos presentados por las moléculas de clase I o clase II, respectivamente. Los epítomos de células T CD4<sup>+</sup> son procesados después del encapsulamiento por células presentadoras de antígeno en vesículas unidas a la membrana, en las que el antígeno es degradado por proteasas en fragmentos de péptidos que se unen a las proteínas del MHC de clase II. Por el contrario, las células T CD8<sup>+</sup> reconocen generalmente antígenos virales o autoantígenos expresados desde dentro de una célula, proteínas que son escindidas en péptidos cortos en el citosol por el inmunoproteasoma. Después de la escisión, los péptidos son translocados por el transportador asociado con el procesamiento del antígeno (TAP) al retículo endoplásmico para la carga sobre los antígenos HLA 1. Los epítomos de células T (auxiliares) CD4<sup>+</sup> son críticos a la hora de dirigir las respuestas inmunitarias dependientes de células T frente a antígenos de proteína.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio, e incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpo o polipéptidos sintéticos que poseen una o más secuencias de CDR o secuencias derivadas de CDR, en tanto los polipéptidos exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpos (Ab) y las inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. En general, se considera a los anticuerpos como Igs con una especificidad definida o reconocida. De esta manera, mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de unión frente a una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad por la diana.

Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, etc.) o subclase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, etc.) (“tipo” y “clase” y “subtipo” y “subclase” se usan de forma intercambiable en la presente). Los anticuerpos nativos o de tipo salvaje, es decir, obtenidos de un miembro de una población no manipulada artificialmente, y las inmunoglobulinas, y los monómeros de anticuerpos poliméricos, tales como IgA e IgM, son usualmente glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en el otro extremo.

Mediante “no manipulado artificialmente” se quiere decir no tratado por medios no naturales, tales como inmunización o transformación, para contenero expresar una molécula extraña de unión al antígeno. El tipo salvaje puede referirse al alelo o especie más frecuente encontrado en una población, o al anticuerpo obtenido de un animal no manipulado artificialmente, así como a los alelos o polimorfismos de origen natural que surgen naturalmente y pueden ser sustentados en una población, o una variante o derivado que surge a través de medios naturales, tales como una neoplasia, en comparación con el obtenido por una forma de manipulación, tal como mutagénesis, el uso de métodos recombinantes, etc., para cambiar un aminoácido de la molécula de unión al antígeno. El uso del término es fácilmente inferido y entendido por el experto en la materia en el contexto de la oración, párrafo, concepto, pensamiento, idea, etc., en el cual se encuentra, se usa, etc., el término

Como se usa en la presente memoria, la expresión “anticuerpo antiglucoesfingolípido de tipo I extendido” significa un anticuerpo o polipéptido derivado que se une específicamente a un glucoesfingolípido de tipo I extendido humano.

El término “variable”, en el contexto de un dominio variable de anticuerpos, se refiere a ciertas partes de una molécula pertinente que difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos, y puede ser integral en el reconocimiento y unión específicos de un anticuerpo particular a una diana particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos.

La variabilidad puede estar concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3), conocidas también como regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena pesada como de cadena ligera. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las secuencias o regiones de armazón (FR). Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan principalmente una configuración de lámina  $\beta$ , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina  $\beta$ . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas, con frecuencia en proximidad, por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana (epítipo o determinante) de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)). Una CDR, tal como la CDR3 de la cadena pesada, puede poseer sola la capacidad para unirse específicamente al epítipo cognado.

Como se usa en la presente memoria, la numeración de los restos de aminoácidos de inmunoglobulinas se hizo de acuerdo con el sistema de numeración de restos de aminoácidos de inmunoglobulinas de Kabat et al., a menos que se indique de otra manera.

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de una cadena de longitud completa o una cadena intacta de un anticuerpo, generalmente la región variable o de unión a la diana. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no están limitados a, fragmentos  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  y  $F_v$ . Un "fragmento funcional" o "análogo de un anticuerpo anti-glucoesfingolípido de tipo I extendido" es aquel que puede unirse a un antígeno cognado. Como se usa en la presente memoria, el fragmento funcional es generalmente sinónimo de "fragmento de anticuerpo" y, con respecto a anticuerpos, puede referirse a fragmentos, tales como  $F_v$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$ , etc., los cuales pueden unirse a un antígeno cognado.

Un fragmento "Fv" consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en una asociación no covalente (dímero de  $V_H$ - $V_L$ ). Esa configuración de tres CDR de cada dominio variable interactúa para definir un sitio de unión a la diana del dímero de  $V_H$ - $V_L$  como en un anticuerpo intacto. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión a la diana en el anticuerpo intacto. Sin embargo, incluso un dominio variable individual (o la mitad de un  $F_v$  que comprende sólo tres CDR específicas para una diana) puede tener la capacidad de reconocer y de unirse a la diana.

Los fragmentos de anticuerpo " $F_v$  de cadena sencilla", " $sF_v$ " o " $scAb$ " comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo, en los que los dominios están presentes en una cadena polipeptídica individual. En general, el polipéptido de  $F_v$  comprende además un enlazador polipeptídico, con frecuencia una molécula flexible, tal como un oligopéptido, que puede obtenerse de una molécula de origen natural, puede derivarse de una molécula de origen natural, es una secuencia artificial, tal como poliglicina, etc., entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$ , lo cual permite que el  $sF_v$  forme la estructura deseada para la unión a la diana. Algunas moléculas pueden incluir uno o más dominios constantes, o una parte de los mismos.

El término "dianticuerpos" se refiere a constructos de fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos pueden comprender un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica. Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios variables en la misma cadena, los dominios del dianticuerpo son forzados a aparearse con los dominios de unión de otra cadena para crear un sitio de unión al antígeno.

El fragmento  $F_{ab}$  contiene los dominios variable y constante de la cadena ligera y el dominio variable y el primer dominio constante ( $C_{H1}$ ) de la cadena pesada. Los fragmentos  $F_{ab}'$  difieren de los fragmentos  $F_{ab}$  por la adición de unos cuantos restos en el término carboxilo del dominio  $C_{H1}$  para incluir una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos  $F_{ab}'$  pueden producirse por escisión del enlace de disulfuro en las cisteínas bisagra del producto de digestión de  $F_{(ab)2}$  con pepsina. Otros tratamientos enzimáticos y químicos de los anticuerpos pueden dar otros fragmentos funcionales de interés.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb o MAb), como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, salvo por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores.

Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los cuales una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homologa a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase (tipo o subtipo) de anticuerpos particular, siendo el resto de la cadena o cadenas idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en tanto que los anticuerpos quiméricos exhiban la actividad biológica deseada de unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido o afecten a la actividad o el metabolismo del glucoesfingolípido de tipo I extendido (patente US nº 4.816.567; y Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6851 (1984)). De esta manera, las CDR de una clase de anticuerpo pueden ser injertadas en el FR de un anticuerpo de clase o subclase

diferente.

Los anticuerpos monoclonales son específicos, siendo dirigidos contra un sitio, epítipo o determinante diana individual. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos) de un antígeno, cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un determinante individual en la diana. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos, siendo sintetizados por una célula hospedante, no contaminados por otras inmunoglobulinas, y proporcionan la clonación del gen relevante y el ARNm que codifica las cadenas de anticuerpo del mismo. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo porque se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se considerará que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para uso con la presente invención pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando técnicas bien conocidas, o pueden purificarse de una preparación policlonal. Los anticuerpos monoclonales precursores que se usarán de conformidad con la presente invención pueden obtenerse por el método de hibridomas descrito por Kohler et al., Nature 256: 495 (1975), o pueden obtenerse por métodos recombinantes bien conocidos en la técnica.

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  u otras subsecuencias de unión a la diana de los anticuerpos) que contienen secuencias derivadas de inmunoglobulina no humana, en comparación con un anticuerpo humano. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente un dominio variable, y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia molde de inmunoglobulina humana.

El anticuerpo humanizado puede comprender también al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina ( $F_c$ ), típicamente aquella del molde de inmunoglobulina humana seleccionado. En general, la meta es tener una molécula de anticuerpo de cierta especificidad que sea mínimamente inmunógena en un ser humano. De esta manera, es posible que uno o más aminoácidos en una o más CDR puedan ser cambiados también por uno que sea menos inmunógeno para un hospedante humano, sin minimizar sustancialmente la función de unión específica de la una o más CDR al glucoesfingolípidio de tipo I extendido.

Alternativamente, la FR puede ser no humana, pero aquellos aminoácidos más inmunógenos son sustituidos por unos menos inmunógenos. No obstante, el injerto de CDR, como se discutió anteriormente, no es la única manera de obtener un anticuerpo humanizado. Por ejemplo, la modificación de solo las regiones CDR puede no ser suficiente para optimizar un anticuerpo, ya que no es raro que los restos de armazón tengan un papel en la determinación de la estructura tridimensional global de los bucles de CDR y la afinidad global del anticuerpo por el ligando.

Por tanto, cualquier medio puede ponerse en práctica para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo, de modo que la molécula de anticuerpo precursora no humana sea modificada para que sea una que sea menos inmunógena para un ser humano, y la identidad de secuencia global con un anticuerpo humano no es siempre una necesidad. Así, la humanización puede lograrse también, por ejemplo, por la mera sustitución de solo unos pocos restos, en particular aquellos que están expuestos sobre la superficie de la molécula de anticuerpo y no enterrados dentro de la molécula y, por tanto, no fácilmente accesibles al sistema inmunitario del hospedante. Dicho método se enseña en la presente memoria con respecto a la sustitución, por ejemplo, de restos cargados o algunos otros restos en la molécula de anticuerpo, siendo la meta reducir o disminuir la inmunogenicidad de la molécula resultante sin que se comprometa la especificidad del anticuerpo por el determinante o epítipo cognado. Véase, por ejemplo, Studnicka et al., Prot Eng 7(6): 805-814, 1994; Mol Imm 44: 1986-1988, 2007; Sims et al., J Immunol 151: 2296 (1993); Chothia et al., J Mol Biol 196: 901 (1987); Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285 (1992); Presta et al., J Immunol 151: 2623 (1993), documento WO 2006/042333 y patente US n° 5.869.619.

Las estrategias y los métodos para hacer accesibles los anticuerpos en la superficie, y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos dentro de un hospedante diferente se describen, por ejemplo, en la patente US n° 5.639.641. En resumen, en un método preferido, (1) se generan alineamientos de las posiciones de un conjunto de regiones variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo para dar posiciones expuestas en la superficie del armazón de la región variable de cadena ligera y pesada, en el que las posiciones del alineamiento para todas las regiones variables son al menos aproximadamente 98% idénticas; (2) se define una serie de restos de aminoácidos expuestos en la superficie del armazón de la región variable de cadena ligera y pesada para un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de roedor (o fragmento del mismo); (3) se identifica una serie de restos de aminoácidos expuestos en la superficie del armazón de la región variable de cadena ligera y pesada que es más estrechamente idéntica a la serie de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de roedor; y (4) la serie de restos de aminoácidos expuestos en la superficie del armazón de la región variable de cadena ligera y pesada definida en la etapa (2) es sustituida por la serie de restos de aminoácidos expuestos en la superficie del armazón de la región variable de cadena ligera y pesada identificada en la etapa (3), salvo por aquellos restos de aminoácidos que están dentro de aproximadamente 5 Å de cualquier átomo de cualquier resto de una CDR del, por ejemplo, anticuerpo de roedor, para dar un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo de roedor que retiene la

especificidad de unión.

Los anticuerpos se pueden humanizar por una variedad de otras técnicas, incluyendo el injerto de CDR (documentos EPO 0 239 400; WO 91/09967; y las patentes US nº 5.530.101 y nº 5.585.089), revestimiento o modificación del patrón de la superficie (documentos EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6): 805-814; y Roguska et al., 1994, PNAS 91: 969-973) y entremezclado de cadenas (patente US nº 5.565.332). Los anticuerpos humanos pueden obtenerse por una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos de presentación de fagos; patentes US nº 4.444.887, nº 4.716.111, nº 5.545.806 y nº 5.814.318; y los documentos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741, usando animales transgénicos, tales como roedores (ratones Amgen, Kirin y Merdarex), usando células quiméricas, etc.

La expresión "homólogo de anticuerpo" u "homólogo" se refiere a cualquier molécula que se une específicamente al glucoesfingolípido de tipo I extendido como se enseña en la presente memoria. De esta manera, un homólogo de anticuerpo incluye un anticuerpo nativo o recombinante, ya sea modificado o no, partes de anticuerpos que retienen las propiedades biológicas de interés, tales como unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido, tal como una molécula  $F_{ab}$  o  $F_v$ , un anticuerpo monocatenario, un polipéptido que posee una o más regiones CDR, etc. La secuencia de aminoácidos del homólogo no necesita ser idéntica a la del anticuerpo de origen natural, sino que puede estar alterada o modificada para llevar aminoácidos sustitutos, aminoácidos insertados, aminoácidos suprimidos, aminoácidos diferentes de los veinte aminoácidos encontrados normalmente en proteínas, etc., para obtener un polipéptido con propiedades mejoradas u otras propiedades beneficiosas.

Los anticuerpos con secuencias homologas son aquellos anticuerpos con secuencias de aminoácidos que tienen homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo antiglucoesfingolípido de tipo I extendido de la presente invención. Preferentemente, la homología es con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de un anticuerpo de la presente invención. "Homología de secuencia", como se aplica a una secuencia de aminoácidos en la presente memoria, se define como una secuencia con al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o más homología de secuencia, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología de secuencia con otra secuencia de aminoácidos, según se determina, por ejemplo, por el método de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85, 2444-2448 (1988).

Un anticuerpo quimérico, como se enseñó anteriormente en la presente memoria, es aquel con diferentes partes de un anticuerpo derivadas de diferentes fuentes, tales como diferentes anticuerpos, diferentes clases de anticuerpo, diferentes especies animales, por ejemplo un anticuerpo que tiene una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino apareada con una región constante de inmunoglobulina humana, etc. De esta manera, un anticuerpo humanizado es una especie de anticuerpo quimérico. Métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica; véanse, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214; Gillies et al., 1989, J Immunol Methods 125: 191-202; y las patentes US nº 5.807.715, nº 4.816.567 y nº 4.816.397.

Los anticuerpos artificiales incluyen fragmentos scFv, anticuerpos quiméricos, dianticuerpos, trianticuerpos, tetrananticuerpos y mru (véase las revisiones por Winter y Milstein, 1991, Nature 349: 293-299; y Hudson, 1999, Curr Opin Imm 11: 548-557), cada uno con capacidad de unión al antígeno o de unión al epítipo. En el fragmento de  $F_v$  monocatenario (svF<sub>v</sub>), los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo están enlazados por un péptido flexible. Típicamente, el enlazador es un péptido de aproximadamente 15 aminoácidos. Si el enlazador es mucho más pequeño, por ejemplo, 5 aminoácidos, se forman dianticuerpos, los cuales son dímeros de scFv bivalentes. Si el enlazador está reducido a menos de tres restos de aminoácidos, se forman estructuras trímeras y tetrámeras que se denominan trianticuerpos y tetraanticuerpos, respectivamente. La unidad de unión más pequeña de un anticuerpo es una CDR, por ejemplo CDR3 de la cadena pesada, que tiene capacidad de reconocimiento molecular y unión específicos suficientes. Tal fragmento se denomina unidad de reconocimiento molecular o mru. Varias de dichas mrus se pueden enlazar juntas con péptidos enlazadores cortos, formando por lo tanto una proteína de unión artificial con una avidéz mayor que una mru individual.

También se incluyen dentro del alcance de la invención los equivalentes funcionales de un anticuerpo de interés. La expresión "equivalentes funcionales" incluye anticuerpos con secuencias homologas, homólogos de anticuerpos, anticuerpos quiméricos, variantes de anticuerpos, derivados de anticuerpos, anticuerpos artificiales y anticuerpos modificados, por ejemplo, en los que cada equivalente funcional se define por la capacidad para unirse al glucoesfingolípido de tipo I extendido. El experto en la materia apreciará que existe un solapamiento en el grupo de moléculas denominadas "fragmentos de anticuerpo" y el grupo denominado "equivalentes funcionales". Los métodos para producir equivalentes funcionales que retienen la capacidad de unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido son conocidos por el experto en la materia, y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/21319, EPO nº 239.400, WO 89/09622, EPO nº 338.745 y EPO nº 332.424.

Los equivalentes funcionales de la presente solicitud incluyen también anticuerpos modificados, por ejemplo anticuerpos modificados por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los



anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, desamidación, fosforilación, amidación, derivación por grupos bloqueadores/protectores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular, enlace a una toxina o parte citotóxica u otra proteína, etc. La unión covalente no necesita dar un anticuerpo que sea inmune a partir de la generación de una respuesta antiidiotípica.

5 Las modificaciones pueden lograrse por técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica, conjugación química, etc. Además, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Existen muchas técnicas para el experto en la materia que permiten la optimización de la afinidad de unión.

10 Típicamente, las técnicas implican la sustitución de diversos restos de aminoácidos en el sitio de interés, seguida de un análisis de identificación de la afinidad de unión del polipéptido mutante por el antígeno o epítipo cognado.

Una vez que el anticuerpo es identificado y aislado, con frecuencia es útil generar un anticuerpo variante o mutante, o muteína, en el que uno o más restos de aminoácido están alterados, por ejemplo, en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo. Alternativamente, o además, se pueden introducir una o más alteraciones (por ejemplo, sustituciones) de los restos del armazón en el anticuerpo, en el que éstas dan como resultado una mejora en la afinidad de unión del mutante de anticuerpo por el glucoesfingolípido de tipo I extendido.

15

Los ejemplos de restos de la región de armazón que pueden ser modificados incluyen aquellos que se unen directamente de forma no covalente al antígeno (Amit et al., *Science* 233: 747-753 (1986)); interaccionan con/afectan a la conformación de una CDR (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)); y/o participan en la interfaz  $V_L$ - $V_H$  (documento EP 239 400). En ciertas formas de realización, la modificación de uno o más restos de la región del armazón da como resultado una mejora de la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno cognado.

20 Por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 restos del armazón pueden ser alterados en la forma de realización particular de la invención. A veces, eso puede ser suficiente para dar un mutante de anticuerpo adecuado para uso en pruebas preclínicas, incluso cuando ninguno de los restos de la región hipervariable ha sido alterado. Normalmente, sin embargo, el mutante de anticuerpo puede comprender una o más alteraciones de la región hipervariable. Las regiones constantes también pueden ser alteradas para obtener propiedades efectoras deseables o más deseables.

25

Los restos de la región hipervariable que son alterados pueden ser cambiados aleatoriamente, especialmente cuando la afinidad de unión de partida del anticuerpo precursor es tal que pueden identificarse fácilmente mutantes de anticuerpo producidos aleatoriamente en busca de la unión alterada en un ensayo como se enseña en la presente.

30

Un procedimiento para obtener mutantes de anticuerpo, tales como mutantes de CDR, es la "mutagénesis por barrido de alanina" (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989); y Cunningham y Wells, *Proc Nat. Acad Sci USA* 84: 6434-6437 (1991)). Uno o más de los restos de la región hipervariable son reemplazados por un resto o restos de alanina o polialanina. Aquel resto o restos de la región hipervariable que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones son refinan entonces introduciendo más u otras mutaciones en o para los sitios de sustitución. De esta manera, mientras que el sitio para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación per se no necesita ser predeterminada. Sustituciones similares pueden intentarse con otros aminoácidos, dependiendo de la propiedad deseada de los restos barridos.

35

Un método más sistemático para identificar restos de aminoácidos a modificar comprende identificar restos de la región hipervariable implicados en la unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido, y aquellos restos de la región hipervariable con poco o ninguna implicación con la unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido. Se realiza un barrido de alanina de los restos de la región hipervariable que no se unen, ensayándose cada mutante de alanina para aumentar la unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido. En otra forma de realización, aquellos restos implicados significativamente en la unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido se seleccionan para ser modificados. La modificación puede implicar la supresión de un resto o la inserción de uno o más restos adyacentes a un resto de interés. Sin embargo, normalmente la modificación implica la sustitución del resto por otro aminoácido. Una sustitución conservativa puede ser una primera sustitución. Si dicha sustitución da como resultado un cambio en la actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión), entonces puede hacerse otra sustitución conservativa para determinar si se obtienen más cambios sustanciales.

40

45

50

55

Puede lograrse una modificación incluso más sustancial en una gama de anticuerpos, y la presentación de propiedades biológicas, seleccionando un aminoácido que difiera más sustancialmente en propiedades de aquel normalmente residente en un sitio. De esta manera, dicha sustitución puede hacerse mientras se mantiene: (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo como una conformación de lámina o helicoidal; (b) la carga o el carácter hidrófobo de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

60

Por ejemplo, los aminoácidos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de la cadena lateral:

65

- (1) hidrófobos: metionina (M o met), alanina (A o ala), valina (V o val), leucina (L o leu) e isoleucina (I o ile);
- (2) neutros, hidrófilos: cisteína (C o cys), serina (S o ser), treonina (T o thr), asparagina (N o asn) y glutamina (Q o gln);
- (3) ácidos: ácido aspártico (D o asp) y ácido glutámico (E o glu);
- (4) básicos: histidina (H o his), lisina (K o lys) y arginina (R o arg);
- (5) restos que influyen sobre la orientación de la cadena: glicina (G o gly) y prolina (P o pro), y
- (6) aromáticos: triptófano (W o trp), tirosina (Y o tyr) y fenilalanina (F o phe).

Las sustituciones no conservativas pueden causar el intercambio de un aminoácido por un aminoácido de otro grupo. Las sustituciones conservativas pueden causar el intercambio de un aminoácido por otro dentro de un grupo.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas pueden incluir aquellas que, por ejemplo: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos.

Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica de origen natural. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferentemente, sustituciones conservativas de aminoácidos) en la secuencia de origen natural (preferentemente, en la parte del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares). Una sustitución conservativa de aminoácidos no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia precursora (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que aparece en la secuencia precursora, o interrumpir otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia precursora), a menos que sea un cambio en el volumen o la conformación del grupo R o la cadena lateral; Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (Branden & Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N. Y. (1991)); y Thornton et al. Nature 354: 105 (1991).

Ordinariamente, el mutante de anticuerpo con propiedades biológicas mejoradas tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera o pesada del anticuerpo anti-glucoesfingolípido de tipo I extendido humano precursor, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% y con frecuencia al menos 95% de identidad. La identidad o similitud con respecto a la secuencia del anticuerpo precursor se define en la presente memoria como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, mismo resto) o similares (es decir, resto de aminoácido del mismo grupo basado en las propiedades comunes de la cadena lateral, más arriba) a los restos del anticuerpo precursor, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia.

Alternativamente, los mutantes de anticuerpo pueden generarse por mutación sistemática de las regiones FR y CDR de las cadenas ligera y pesada, o la región F<sub>c</sub> del anticuerpo anti-glucoesfingolípido de tipo I extendido.

Otro procedimiento para generar mutantes de anticuerpo implica el uso de maduración por afinidad usando la presentación de fagos (Hawkins et al., J Mol Biol 254: 889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry 30(45): 10832-10838 (1991)). Es conocido que las fusiones de proteína-cubierta del bacteriófago (Smith, Science 228: 1315 (1985); Scott y Smith, Science 249: 386 (1990); Cwirla et al., Proc Natl Acad Sci USA 8: 309 (1990); Devlin et al. Science 249: 404 (1990); Wells y Lowman, Curr Opin Struct Biol 2: 597 (1992); y patente US n° 5.223.409) son útiles para ligar el fenotipo de proteínas o péptidos presentados con el genotipo de las partículas de bacteriófago que los codifican. Los dominios F<sub>ab</sub> de los anticuerpos han sido presentados también en fagos (McCafferty et al., Nature 348: 552 (1990); Barbas et al. Proc Natl Acad Sci USA 88: 7978 (1991); y Garrard et al. Biotechnol 9: 1373 (1991)).

La presentación de fagos monovalentes consiste en presentar una serie de variantes de proteína como fusiones de una proteína de la cubierta del bacteriófago sobre partículas de fagos (Bass et al., Proteins 8: 309 (1990)). La maduración por afinidad, o mejora de las afinidades de unión en equilibrio de diversas proteínas, se ha logrado previamente a través de la aplicación sucesiva de mutagénesis, presentación de fagos monovalentes y análisis funcional (Lowman y Wells, J Mol Biol 234: 564 578 (1993); y patente US n° 5.534.617), así como usando ese enfoque con los dominios de F<sub>ab</sub> de los anticuerpos (Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 91: 3809 (1994); y Yang et al., J Mol Biol 254: 392 (1995)).

Pueden construirse bibliotecas de muchas variantes de proteína (por ejemplo, 10<sup>6</sup> o más), que difieren en posiciones definidas en la secuencia, sobre partículas de bacteriófagos, cada una de las cuales contiene ADN que codifica la variante proteica particular. De esta manera, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6 a 7 sitios) son mutados para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Después de ciclos de purificación por afinidad, usando un antígeno inmovilizado, se aíslan clones de bacteriófago individuales, y la

secuencia de aminoácidos de la proteína presentada se deduce a partir del ADN.

Después de la producción del mutante de anticuerpo, la actividad biológica de esa molécula con respecto al anticuerpo precursor puede determinarse como se enseña en la presente. Como se indicó anteriormente, esto puede implicar determinar la afinidad de unión y/u otras actividades biológicas o propiedades físicas del anticuerpo. En una forma de realización preferida de la invención, un panel de mutantes de anticuerpo se prepara y se selecciona para la afinidad de unión por el antígeno. Uno o más de los mutantes de anticuerpo seleccionados de la selección se someten opcionalmente a una o más ensayos de actividad biológica adicionales para confirmar que el mutante o mutantes de anticuerpo tienen propiedades nuevas o mejoradas. En las formas de preferidas, el mutante de anticuerpo retiene la capacidad para unirse al glucoesfingolípido de tipo I extendido con una afinidad de unión similar a o mejor/mayor que la del anticuerpo precursor.

Alternativamente, también pueden usarse fagos multivalentes (McCafferty et al. (1990) Nature 348: 552-554; y Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628) para expresar mutaciones de punto aleatorias (por ejemplo, generadas por el uso de una ADN polimerasa propensa a error), para generar una biblioteca de fragmentos de anticuerpo del fago que entonces podrían ser seleccionados para afinidad con el glucoesfingolípido de tipo I extendido; Hawkins et al. (1992), J Mol Biol 254: 889-896.

Preferentemente, durante el procedimiento de maduración por afinidad, el vector de expresión replicable está bajo el fuerte control de un elemento regulador de la transcripción, y las condiciones de cultivo se ajustan de modo que la cantidad o el número de partículas que presentan más de una copia de la proteína de fusión sea menor que aproximadamente 1%. También preferentemente, la cantidad de partículas que presentan más de una copia de la proteína de fusión es menor que aproximadamente 10% de la cantidad de partículas que presentan una copia individual de la proteína de fusión. Preferentemente, la cantidad es menor que aproximadamente 20%.

Otra frase equivalente usada en la presente memoria es una parte de unión al antígeno, que se refiere a aquella parte de un anticuerpo de interés que se une a un epítipo del glucoesfingolípido de tipo I. Se considera que todas las frases y términos usados en la presente memoria para describir diversos cambios que pueden hacerse a un anticuerpo original están dentro del alcance de la frase "porción de unión al antígeno". Por lo tanto, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, tal como una molécula  $F_{ab}$ , un  $F_v$ , un scAb, un mru, cualquiera de dichos fragmentos funcionales, una variante de anticuerpo tal como un alelo o una molécula que contiene un cambio en la secuencia de aminoácidos primaria de la misma, un derivado, tal como un anticuerpo quimérico o humanizado, un análogo, etc., incluyendo equivalentes funcionales que incluyen formas genéticamente modificadas de un anticuerpo de interés, homólogos de anticuerpo como se describen en la presente memoria, etc., se incluyen en la frase parte de unión al antígeno.

El mutante o mutantes de anticuerpo seleccionados de esta manera pueden ser sometidos a más modificaciones, dependiendo a menudo del uso pretendido del anticuerpo. Dichas modificaciones pueden implicar la alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, la fusión con polipéptidos heterólogos y/o modificaciones covalentes. Por ejemplo, un resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada del mutante de anticuerpo puede ser sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. A la inversa, puede añadirse una cisteína al anticuerpo para mejorar la estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento  $F_v$ ).

Otro tipo de mutante de anticuerpo tiene un patrón de glucosilación alterado. Esto puede lograrse añadiendo o suprimiendo una o más de los restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo, y/o añadiendo o suprimiendo uno o más de los sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de los anticuerpos está enlazada típicamente mediante N a Asn, o está enlazada mediante O a Ser o Thr. Las secuencias tripeptídicas, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido salvo prolina, son secuencias de reconocimiento comunes para la unión enzimática de una parte de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa o xilosa, por ejemplo, están enlazadas a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque pueden usarse también 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición o sustitución de uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original puede aumentar la probabilidad de la glucosilación enlazada mediante O.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para mejorar la eficacia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden introducirse restos de cisteína en la región  $F_c$ , permitiendo de esta manera la formación de enlaces de disulfuro entre cadenas en esa región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener capacidad de incorporación mejorada y/o destrucción de células incrementada mediada por el complemento, y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC); véase Caron et al., J Exp Med 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, Immunol 148: 2918-2922 (1993). Dicho derivado de anticuerpo o análogo del mismo puede ser también más resistente a la degradación *in vivo*.

Alternativamente, puede diseñarse un anticuerpo que tenga regiones  $F_c$  dobles, y puede tener de esta manera lisis del complemento y capacidades de ADCC mejoradas; véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230(1989).

Las modificaciones covalentes del anticuerpo están comprendidas dentro del alcance de la invención. Dichas modificaciones pueden realizarse 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 restos de aminoácido del anticuerpo seleccionados como diana con un agente de derivación orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con el resto N-terminal o C-terminal.

Pueden hacerse reaccionar restos de cisteinilo con  $\alpha$ -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para proporcionar derivados de carboxilmetilo o carboxiamidometilo. Los restos de cisteinilo pueden ser derivados también por reacción con bromotri-fluoroacetona, ácido  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidadas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de 2-piridilo y metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuro-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol, por ejemplo.

Los restos de histidilo pueden ser derivados por reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5 a 7,0. Puede usarse también bromuro de p-bromofenacilo, y la reacción se lleva a cabo preferentemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

Pueden hacerse reaccionar restos  $\alpha$ -terminales y de lisinilo con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico, para invertir la carga de los restos. Otros reactivos adecuados para derivar restos que contienen  $\alpha$ -amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, borohidruro de cloro, ácido trinitrobenzensulfónico, O-metilisourea y 2,4-pentanodiona, y el aminoácido puede ser catalizado por transaminasa con glioxilato.

Los restos de arginilo pueden ser modificados por reacción con uno o varios reactivos convencionales, tales como fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de los restos de arginina requiere con frecuencia condiciones de reacción alcalinas. Además, los reactivos pueden reaccionar con lisina, así como el grupo  $\epsilon$ -amino de la arginina.

La modificación específica de los restos de tirosilo puede hacerse con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Por ejemplo, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los restos de tirosilo pueden ser yodados usando  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  para preparar proteínas marcadas para uso en un radioinmunoensayo.

Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden ser modificados por reacción con carbodiimidadas (R-N=C=C-R'), en las que R y R' pueden ser grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-metil-3-(4-azonia-4,4-dimetilfenil)carbodiimida. Además, los restos de aspartilo y glutamilo se pueden convertir en restos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

Los restos de glutaminilo y asparaginilo son desamidados con frecuencia hasta los restos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de esos restos está dentro del alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de los restos de serinilo o treonilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales de la lisina, arginina e histidina (Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, p. 79-86 (1983)), acetilación de la amina N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente implica acoplar química o enzimáticamente hidratos de carbono y glucósidos al anticuerpo. Dichos procedimientos no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedante que tenga capacidades de glucosilación para la glucosilación enlazada mediante N o enlazada mediante O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o azúcares pueden estar unidos a: (a) arginina e histidina; (b) grupos carboxilo libres; (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de la cisteína; (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina; (e) restos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano; o (f) el grupo amida de la glutamina. Dichos métodos se describen en el documento WO 87/05330 y en Aplin y Wriston, *CRC Crit Rev Biochem*, pp. 259-306 (1981).

La eliminación de cualquier resto de hidrato de carbono presente en el anticuerpo puede lograrse química o enzimáticamente. La desglucosilación química, por ejemplo, puede requerir la exposición del anticuerpo al compuesto, ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente, dando como resultado la escisión de la mayor parte o de todos los azúcares salvo el azúcar enlazante (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), a la vez que deja el anticuerpo intacto. La desglucosilación química se describe, por ejemplo, en Hakimuddin et al., *Arch Biochem Biophys* 259: 52 (1987) y en Edge et al., *Anal Biochem* 118: 131 (1981). La escisión enzimática de los restos de hidrato de carbono en los anticuerpos puede lograrse por cualquiera de una variedad de endoglucosidasas y exoglucosidasas, como se describe, por ejemplo, en Thotakura et al., *Meth Enzymol* 138: 350(1987).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende el enlazamiento del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la manera expuesta en las patentes US nº 4.640.835; nº 4.496.689; nº 4.301.144; nº 4.670.417; nº 4.791.192 o nº 4.179.337.

5 Los equivalentes funcionales pueden producirse intercambiando diferentes CDR de diferentes cadenas de anticuerpo dentro de un armazón o un FR mixto derivado de anticuerpos plurales. De esta manera, por ejemplo, son posibles diferentes clases de anticuerpo para una serie dada de CDR mediante sustitución de diferentes cadenas pesadas, por ejemplo IgG<sub>1-4</sub>, IgM, IgA<sub>1-2</sub> o IgD, para dar diferentes tipos e isotipos de anticuerpos anti-glucosfingolípido de tipo I extendido. De forma similar, pueden producirse anticuerpos artificiales dentro del alcance  
10 de la invención incluyendo una serie dada de CDR dentro de un armazón enteramente sintético.

Los fragmentos de anticuerpo y equivalentes funcionales de la presente invención comprenden aquellas moléculas con un grado detectable de unión específica al glucosfingolípido de tipo I extendido. Un grado detectable de unión incluye todos los valores en el intervalo de al menos 10 a 100%, preferentemente por lo menos 50%, 60% o 70%,  
15 más preferentemente por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de la capacidad de unión de un anticuerpo de interés. También están incluidos los equivalentes con una afinidad mayor que 100% que la del anticuerpo de interés.

Las CDR son generalmente de importancia para el reconocimiento del epítipo y la unión al anticuerpo. Sin embargo, pueden introducirse cambios a los restos que comprenden las CDR sin que interfieran con la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse al epítipo cognado. Por ejemplo, pueden introducirse cambios que no afecten al reconocimiento del epítipo, y sin embargo incrementen la afinidad de unión del anticuerpo por el epítipo. Varios estudios han examinado los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en diversas posiciones en la secuencia de un anticuerpo, basado en el conocimiento de la secuencia del anticuerpo primaria, en sus propiedades, tales como la unión y nivel de expresión (Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392-403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-8915; y Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535-539).  
20  
25

De esta manera, pueden generarse equivalentes de un anticuerpo de interés cambiando las secuencias de los genes de la cadena ligera y pesada en las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3, o en las regiones de armazón, usando métodos tales como mutagénesis dirigida al sitio mediada por oligonucleótidos, mutagénesis de cassette, PCR propensa a error, entremezclado de ADN, modificación de aminoácidos, o cepas mutadoras de E. coli (Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16: 535-539; y Adey et al., 1996, capítulo 16, p. 277-291, en Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press), por ejemplo. Los métodos del cambio de la secuencia de ácidos nucleicos del anticuerpo primario pueden dar como resultado anticuerpos con afinidad mejorada (Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 3576-3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97: 10701-10705; Davies y Riechmann, 1996, Immunotech 2: 169-179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256: 77-88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277: 16365-16370; y Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276: 27622-27628).  
30  
35

Pueden usarse ciclos repetidos de "selección de polipéptidos" para seleccionar una mayor afinidad de unión, por ejemplo la selección de cambios de aminoácidos múltiples que se seleccionan por múltiples ciclos de selección. Después de una primera ronda de selección, que implica una primera región de selección de aminoácidos en el ligando o polipéptido del anticuerpo, se llevan a cabo rondas adicionales de selección en otras regiones o aminoácidos del ligando. Los ciclos de selección se repiten hasta que se logren las propiedades de afinidad deseadas.  
40

45 Los anticuerpos mejorados incluyen también aquellos anticuerpos que tienen características mejoradas que se preparan por las técnicas estándar de inmunización de animales, formación de hibridomas y selección de anticuerpos con características específicas.

"Antagonista" se refiere a una molécula capaz de inhibir una o más actividades biológicas asociadas con el glucosfingolípido de tipo I extendido. Los antagonistas pueden interferir con el mantenimiento y el crecimiento de una célula que expresa un glucosfingolípido tipo I. Todos los puntos de intervención por un antagonista se consideran como equivalentes para los fines de la presente invención. De esta manera, se incluyen dentro del alcance de la invención los antagonistas, por ejemplo anticuerpos neutralizantes que se unen al glucosfingolípido de tipo I extendido.  
50  
55

"Agonista" se refiere a un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un conjugado, etc., que activa una o más actividades biológicas del glucosfingolípido de tipo I extendido, o una célula que expresa el mismo. Los agonistas pueden actuar como un mitógeno de células que expresan un glucosfingolípido tipo I. Todos los puntos de intervención por un agonista deben considerarse como equivalentes para los fines de la presente invención. De esta manera, se incluyen dentro del alcance de la invención los anticuerpos que se unen a glucosfingolípido de tipo I extendido y mejoran una actividad, tal como por ejemplo la diferenciación.  
60

Los términos "célula", "líneas de células" y "cultivo de células" incluyen la progenie de los mismos. Se entiende también que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica, tal como en el contenido de ADN, debido a mutación deliberada o inadvertida. La progenie variante que tiene la misma función o propiedad biológica de interés, como se examina en la célula original, se incluye en el alcance de la invención. Las "células hospedantes" usadas en  
65

la presente invención son generalmente hospedantes procariotas o eucariotas, seleccionados como una elección de diseño.

5 La “transformación” de un organismo celular, célula o línea de células con un ácido nucleico significa introducir un ácido nucleico en la célula diana, de modo que el ácido nucleico sea replicable, ya sea como un elemento extracromosómico o por integración cromosómica y, opcionalmente, sea expresado. La “transfección” de una célula u organismo con un ácido nucleico se refiere a la absorción del ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, por la célula u organismo, ya sea que alguna secuencia codificante sea expresada de hecho o no. Las expresiones “célula hospedante transfectada” y “transformada” se refieren a una célula en la cual se introdujo un ácido nucleico.  
10 Células hospedantes procariotas típicas incluyen varias cepas de *E. coli*. Las células hospedantes eucariotas típicas son células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino, o células de origen humano. La secuencia de ácido nucleico introducida puede ser de la misma especie que la célula hospedante, o de una especie diferente de la célula hospedante, o puede ser una secuencia de ácido nucleico híbrida, que contiene algunos ácidos nucleicos extraños y algunos ácidos nucleicos homólogos. La transformación puede ocurrir también por transducción o infección con elementos o vehículos derivados de virus.  
15

El término “vector” hace referencia a un constructo de ácido nucleico, un vehículo que contiene un ácido nucleico, el transgen, el gen extraño o el gen de interés, que puede estar enlazado operablemente a secuencias de control adecuadas, para la expresión del transgen en un hospedante adecuado. Dichas secuencias de control incluyen, por ejemplo, un promotor que efectúa la transcripción, una secuencia de operador opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago, o solo un inserto genómico potencial. Una vez transformado en un hospedante adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma del hospedante, o puede en algunos casos integrarse en el genoma de una célula hospedante u otro ácido nucleico. En la presente memoria descriptiva, los términos “plásmido” y “vector” se usan de forma intercambiable, ya que un plásmido es una forma de vector comúnmente usada. Sin embargo, se pretende que la invención incluya dichas otras formas de vectores que cumplen una función equivalente como vehículo y las cuales se conocen o serán conocidas en la técnica, tales como virus, fagémidos, transposones, moléculas sintéticas que poseen ácidos nucleicos, liposomas, y similares.  
20  
25  
30

“Mamífero”, en el contexto de tratamiento de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo ser humano, animales domésticos y de granja, primates no humanos y animales de zoológico, de entretenimiento o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.  
35

Los anticuerpos de interés pueden seleccionarse o pueden usarse en un ensayo como se describe en la presente memoria o como es conocido en la técnica. Con frecuencia, dichos ensayos requieren que un reactivo sea detectable, es decir, por ejemplo, marcado. El término “marcador”, cuando se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o composición detectable que puede ser conjugado directa o indirectamente a una molécula o proteína, por ejemplo un anticuerpo. El marcador puede ser por sí mismo detectable (por ejemplo, marcadores de radioisótopos, partículas o marcadores fluorescentes), o puede ser un instrumento para obtener una señal detectable, tal como, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que es entonces detectable.  
40

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “fase sólida” significa una matriz a la cual puede adherirse o unirse una entidad o molécula, tal como el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas comprendidas en la presente memoria incluyen aquellas formadas parcial o enteramente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poros controlados), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), plásticos, polipropilenos, poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas formas de realización, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras formas de realización puede usarse en una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). De esta manera, la fase sólida puede ser un papel, una perla, un plástico, un chip, etc., puede estar realizado en una variedad de materiales, tales como nitrocelulosa, agarosa, poliestireno, polipropileno, silicio, etc., y puede estar en una variedad de configuraciones.  
45  
50

Las células que expresan el glucoesfingolípido de tipo I extendido o glucanos del mismo, tales como preparaciones de membrana celular, así como el glucoesfingolípido de tipo I extendido purificado, pueden usarse como inmunógenos para generar anticuerpos de interés. El inmunógeno puede obtenerse o puede aislarse de fuentes naturales, o puede sintetizarse enzimática o químicamente. Pueden usarse células enteras, tales como células que expresan el glucoesfingolípido de tipo I extendido, o células derivadas de una fuente natural o de cánceres, tales como líneas de células cancerosas. Las células que sobreexpresen el glucoesfingolípido de tipo I extendido pueden usarse como el inmunógeno para obtener los anticuerpos de interés. Asimismo, pueden usarse preparaciones de membrana que posean el glucoesfingolípido de tipo I extendido, como es sabido en la técnica. Dichas células y partes de las mismas pueden usarse como la fuente de antígenos en un ensayo de diagnóstico.  
55  
60

Las moléculas de ácido nucleico que codifican mutantes de la secuencia de aminoácidos pueden prepararse por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Los métodos incluyen, pero no están limitados a, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de cassette de un mutante  
65

previamente preparado o una versión no mutante de la molécula de interés (véase, por ejemplo, Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82: 488 (1985)).

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o análogo del mismo (por ejemplo, una cadena ligera o pesada de un anticuerpo de la invención, un anticuerpo monocatenario de la invención, o una muteína de anticuerpo de la invención) incluye la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento del anticuerpo, como se describe en la presente. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante, como es conocido en la técnica. Se construye un vector de expresión que contiene secuencias codificantes del anticuerpo y señales de control de la transcripción y traducción adecuadas. Los métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

El vector de expresión es transferido a una célula hospedante por técnicas convencionales, y las células transfectadas se cultivan entonces por técnicas convencionales para producir un anticuerpo, o fragmento, de la invención. En un aspecto de la invención, los vectores que codifican tanto las cadenas ligera como pesada pueden ser coexpresados en la célula hospedante para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, como se detalla en la presente.

Una variedad de sistemas de vector de expresión/hospedante puede usarse para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de expresión representan vehículos por los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y pueden purificarse subsiguientemente, pero representan también células las cuales pueden expresar, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias codificantes nucleotídicas adecuadas, una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Las células bacterianas tales como *E. coli*, y células eucariotas se usan comúnmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante, especialmente para la expresión de toda la molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, células de mamífero tales como células CHO, junto con un vector tal como uno que posea el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano, son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., Gene 45: 101 (1986); y Cockett et al., Bio/Technology 8: 2 (1990)). Plantas y cultivos de células vegetales, células de insecto, etc., pueden usarse también para obtener las proteínas de interés, como es conocido en la técnica.

Además, se selecciona una célula hospedante que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedantes pueden tener los mecanismos característicos y específicos particulares para la modificación y el procesamiento postraduccional deseados de las proteínas y los productos génicos. Pueden seleccionarse sistemas hospedantes o líneas de células adecuados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos del anticuerpo expresado de interés. Por lo tanto, pueden usarse células hospedantes eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, así como la glucosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células hospedantes de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, COS, 293, 3T3 o de mieloma.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse líneas de células que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación virales, las células hospedantes pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, promotor, secuencias potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, puede permitirse que las células diseñadas crezcan durante uno a dos días en un medio enriquecido, y entonces son movidas a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección, y permite que las células integren establemente el plásmido en un cromosoma y sea expandido en una línea de células. Alternativamente, puede mantenerse un elemento extracromosómico en las células bajo selección. Dichas líneas de células diseñadas no solo son útiles para la producción de anticuerpos, sino que son útiles para seleccionar y evaluar compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse muchos sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, el uso de genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., Cell 11: 223 (1977)), de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska et al., Proc Natl Acad Sci USA 48: 202 (1992)), de glutamato sintasa, en presencia de metionina sulfoximida (Adv Drug Del Rev 58, 671, 2006, y véase el sitio web o la bibliografía de Lonza Group Ltd.) y de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22: 817 (1980)) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, la resistencia antimetabolitos puede usarse como la base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., Proc Natl Acad Sci USA 77: 357 (1980); O'Hare et al., Proc Natl Acad Sci USA 78: 1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan et al., Proc Natl Acad Sci USA 78: 2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu et al., Biotherapy 3: 87 (1991)); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., Gene 30: 147 (1984)). Los métodos conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante pueden aplicarse habitualmente para seleccionar el

clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press (1990); Dracopoli et al., eds., *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons (1994); y Colberre-Garapin et al., *J Mol Biol* 150: 1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden incrementarse por la amplificación del vector (véase, por ejemplo, Bebbington et al., en *DNA Cloning*, Vol. 3. Academic Press (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, un incremento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo incrementará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también se incrementará (Crouse et al., *Mol Cell Biol* 3: 257 (1983)).

La célula hospedante puede ser cotransfectada con dos o más vectores de expresión de la invención, por ejemplo, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada, y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la misma expresión de los polipéptidos de cadena ligera y pesada. Alternativamente, puede usarse un vector individual que codifique y sea capaz de expresar polipéptidos tanto de cadena ligera como pesada. En dichas situaciones, la cadena ligera puede ser colocada antes de la cadena pesada para evitar un exceso de la cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322: 52 (1986); y Kohler, *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas ligera y pesada pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención ha sido producida por un animal, sintetizada químicamente o expresada de forma recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo por cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, en particular por cromatografía de afinidad por el glucoesfingolípido de tipo I extendido después de cromatografía de exclusión por tamaños y de proteína A, etc.), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden ser fusionados con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente memoria o conocidas de otra manera en la técnica, para facilitar la purificación.

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. De esta manera, una estructura de tipo I extendida purificada puede usarse como antígeno, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante completo o incompleto de Freund. Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales, aunque debido a la modificación de los anticuerpos para optimizar su uso en seres humanos, así como para optimizar el uso del anticuerpo per se, se prefieren los anticuerpos monoclonales debido a la facilidad de producción y manipulación de proteínas particulares. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia (Harlow et al., *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a. ed. (1988)).

Por ejemplo, un inmunógeno, como se ejemplifica en la presente memoria, puede administrarse a diversos animales hospedantes, incluyendo, pero sin limitarse a, conejos, ratones, camélidos, ratas, etc., para inducir la producción de suero que contiene anticuerpos policlonales específicos para el glucoesfingolípido de tipo I extendido. La administración del inmunógeno puede acarrear una o más inyecciones de un agente de inmunización y, si se desea, un adyuvante. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie de hospedante, e incluyen, pero no están limitados a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), aceite mineral, geles, alumbre (hidróxido de aluminio), sustancias tensoactivas tales como lisolectina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de la lapa californiana (KLH), dinitrofenol y adyuvantes de humano potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden usarse incluyen el adyuvante de MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Los protocolos de inmunización son bien conocidos en la técnica, y pueden llevarse a cabo por cualquier método que induzca una respuesta inmunitaria en el hospedante animal elegido. De esta manera, pueden usarse diversas vías de administración durante diversos períodos de tiempo como una elección de diseño.

Típicamente, el inmunógeno (con o sin adyuvante) es inyectado en el mamífero por inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples, o intramuscularmente o intravenosamente. En ciertas circunstancias, pueden usarse células enteras que expresen el glucoesfingolípido de tipo I extendido. Dependiendo de la naturaleza del inmunógeno (es decir, porcentaje de hidrofobia, porcentaje de hidrofilia, estabilidad, carga neta, punto isoeléctrico, etc.), el glucoesfingolípido de tipo I extendido o parte del mismo puede ser modificado o conjugado para que sea inmunógeno o más inmunógeno en el animal, tal como un mamífero, que está siendo inmunizado. Por ejemplo, el glucoesfingolípido de tipo I extendido o una parte del mismo se pueden conjugar a un vehículo. La conjugación incluye conjugación química derivando grupos químicos funcionales activos en cualquiera del inmunógeno y de la proteína inmunógena a conjugar, o en ambos, de modo que se forme un enlace covalente, u otros métodos conocidos por el experto en la materia. Ejemplos de dichos vehículos o proteínas inmunógenas incluyen, pero no se limitan a, KLH, ovoalbúmina, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de soja y péptidos auxiliares T promiscuos. Diversos adyuvantes pueden usarse para incrementar la respuesta inmunológica, como se describió anteriormente.



Una vez que se obtiene una preparación adecuada, es posible aislar los anticuerpos particulares de los anticuerpos plurales mediante técnicas de separación conocidas, tales como cromatografía de afinidad, inmunopurificación, absorción, etc. De esa manera, puede obtenerse una especie de anticuerpo individual para estudio posterior, por ejemplo por secuenciación, para obtener las secuencias de aminoácidos de una o más CDR.

Los anticuerpos de la presente invención comprenden preferentemente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando la tecnología de hibridomas, tal como es descrita por Kohler et al., *Nature* 256: 495 (1975); patente US nº 4.376.110; Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a. ed. (1988); y Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier (1981), métodos de ADN recombinante, por ejemplo preparando y usando transfectomas, u otros métodos conocidos por los expertos. Otros ejemplos de métodos que pueden usarse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero no están limitados a, la técnica de hibridomas de células B humanas (Kosbor et al, *Immunology Today* 4: 72 (1983); y Cole et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026 (1983)), y la técnica de hibridomas de EBV (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, p. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA e IgD, y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el mAb de la invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

En el modelo de hibridomas, un hospedante tal como un ratón, un ratón humanizado, un ratón transgénico con genes del sistema inmunitario humano, un caballo, oveja, hámster, conejo, rata, camello o cualquier otro animal hospedante adecuado, es inmunizado para obtener los linfocitos para que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al glucoesfingolípidio de tipo I extendido.

Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Los linfocitos son entonces fusionados 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*, Academic Press, p. 59-103 (1986)).

En general, en la producción de hibridomas que producen anticuerpos, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de los ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero no humano. Las líneas de células inmortalizadas son usualmente células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de origen de roedor, bovino o humano. Típicamente, se usa una línea de células de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene de preferencia una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas de células inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, apoyan la producción estable de alto nivel de anticuerpos por las células seleccionadas que producen anticuerpos, y son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Entre las líneas de células de mieloma están las líneas de células de mieloma murinas, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif., y las células SP2/0, FO o X63-Ag8-653, disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, VA. Puede usarse también la línea de células de mieloma de ratón NSO (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, Reino Unido).

También se han descrito líneas de células de heteromioma de ser humano-ratón y de mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kosbor, *J Immunol* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc, p. 51-63 (1987)).

Otra alternativa es usar la fusión eléctrica en lugar de la fusión química para formar hibridomas. En lugar de la fusión química, una célula B puede ser inmortalizada usando, por ejemplo, el virus de Epstein-Barr u otro gen transformante; véase, por ejemplo, Zurawaki et al., en *Monoclonal Antibodies*, ed., Kennett et al., Plenum Press, p. 19-33 (1980). También pueden usarse ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas, y ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) trasplantados con linfocitos B humanos.

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma se cultivan se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el glucoesfingolípidio de tipo I extendido. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma puede determinarse por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA), análisis fluorocitométrico (FACS) o ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Dichas técnicas se conocen en la técnica, y son conocidas por el experto en la materia. Asimismo, puede usarse el sistema Biacore, como es conocido en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal al glucoesfingolípidio de tipo I extendido puede determinarse, por ejemplo, por un análisis de Scatchard (Munson et al., *Anal Biochem* 107: 220 (1980)).

Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o

actividad deseadas, los clones pueden ser subclonados por procedimientos de dilución limitante, y pueden ser cultivados por métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, p. 59-103 (1986)). Los medios de cultivo adecuados incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM) o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse crecer in vivo como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones son separados o aislados adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o del suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A Sepharose, proteína G Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Existe en la técnica una variedad de métodos para la producción de anticuerpos monoclonales y, de esta manera, la invención no se limita a su sola producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente US nº 4.816.567. Alternativamente, los anticuerpos humanos pueden obtenerse de animales transgénicos, tales como el ratón KM discutido anteriormente. En ese contexto, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un clon eucariota, viral o procarionta individual.

De esta manera, mediante el uso de células cancerosas humanas que se sabe que expresan una estructura de cadena de tipo I extendida, como es el caso de las células Colo205, o un compuesto que contiene la cadena de tipo I extendida, tal como el glucoesfingolípido, tal como Le<sup>b</sup>/Le<sup>a</sup>, como antígeno, ratones endógamos o transgénicos son inmunizados y revacunados como es conocido en la técnica. Se obtienen bazos, las células se fusionan con células de mieloma, y se obtienen y se cultivan los hibridomas. Los sobrenadantes de células se seleccionan por ELISA usando, por ejemplo, Le<sup>b</sup>/Le<sup>a</sup> como el reactivo de captura. Se amplifican los clones positivos. IMH2 es un ejemplo de un anticuerpo monoclonal de I<sub>g</sub>G<sub>3</sub> de ratón que se une específicamente a una estructura de cadena de tipo I extendida.

Mediante el uso de un modelo de ratón transgénico, pueden producirse anticuerpos humanos inmunizando los ratones transgénicos con un inmunógeno de cadena de tipo I extendida. Dichos anticuerpos pueden ser generados sobre una base libre, por ejemplo por Medarex, NJ y Amgen, CA. Mediante el uso del ratón KM, el anticuerpo monoclonal GNX-8 (IgG<sub>1</sub>) se seleccionó para caracterización y uso posteriores.

El GNX-8 es un anticuerpo citotóxico. En ensayos que usan células de cáncer de colon Colo205 como dianas, GNX-8 lisó las células de la línea de células cancerosas, y al menos a 50 pg/ml, el anticuerpo lisó todas las células en el cultivo. GNX-8 no se une a los RBCs. El anticuerpo se une a las células de cáncer colorrectal, células de cáncer de mama y células de cáncer de pulmón. A diferencia de IMH2, GNX-8 no se une a Le<sup>x</sup>-Le<sup>x</sup> o a Le<sup>y</sup>.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención es fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos, o dichas cadenas de fuentes humanas, humanizadas u otras fuentes) (Innis et al. en *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, Academic Press (1990), y Sanger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463 (1977)). Las células de hibridoma pueden servir como la fuente de dicho ADN.

Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, los cuales son transfectados entonces en células hospedantes tales como células de *E. coli*, células NSO, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen la proteína inmunoglobulínica, para lograr la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedantes recombinantes. El ADN puede ser modificado también, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena ligera y pesada humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente US nº 4.816.567; y Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina, la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. Dicho polipéptido no inmunoglobulínico puede sustituirse para los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse para los dominios variables de un sitio de combinación del glucoesfingolípido de tipo I extendido de un anticuerpo de la invención, para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena pesada modificada y la cadena ligera de inmunoglobulina. La cadena pesada es truncada generalmente en cualquier punto en la región F<sub>c</sub> para prevenir la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los restos de cisteína relevantes son sustituidos por otro resto de aminoácido, o son suprimidos para prevenir la reticulación.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Tradicionalmente, dichos fragmentos se obtienen por medio de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *J Biochem Biophys Methods* 24: 107 (1992); y Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985)). Por ejemplo, los fragmentos F<sub>ab</sub> y F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub> de la invención pueden producirse por escisión proteolítica de

moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos  $F_{ab}$ ) o pepsina (para producir fragmentos  $F_{(ab)2}$ ). Los fragmentos  $F_{(ab)2}$  contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio  $C_{H1}$  de la cadena pesada. Sin embargo, dichos fragmentos pueden ser producidos directamente por células hospedantes recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de una biblioteca de fagos de anticuerpos. Alternativamente, fragmentos  $F_{(ab)2}$ -SH pueden recuperarse directamente de *E. coli*, y pueden ser acoplados químicamente para formar fragmentos  $F_{(ab)2}$  (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163 (1992). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos  $F_{(ab)2}$  pueden aislarse directamente del cultivo de células hospedantes recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los expertos en la materia. En otras formas de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento  $F_v$  monocatenario ( $F_v$ ); véase, por ejemplo, el documento WO 93/16185.

Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica; véase, por ejemplo, Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); Oi et al., *BioTechniques* 4: 214 (1986); Gillies et al., *J Immunol Methods* 125: 191 (1989); y las patentes US nº 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Los anticuerpos humanizados derivan de moléculas de anticuerpo generadas en una especie no humana que se unen al glucoesfingolípido de tipo I extendido, en el que una o más CDR de las mismas son insertadas en las regiones FR de una molécula de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden ser humanizados usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, el injerto de CDR (documentos EPO 239.400; y WO 91/09967; y las patentes US nº 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o modificación del patrón de la superficie (documentos EPO 592.106; y EPO 519.596; Padlan, (1991), *Molecular Immunology*; Studnicka et al., (1994), *Protein Engineering* 7:805; y Roguska et al., (1994), *Proc Natl Acad Sci* 91:969 y entremezclado de cadenas (véase la patente US nº 5.565.332).

Un anticuerpo humanizado presenta uno o más restos de aminoácidos de una fuente que es no humana. Los restos de aminoácidos no humanos son referidos con frecuencia como restos "introducidos", los cuales se toman típicamente de un dominio variable "introducido". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo los métodos de Winter et al. (Jones et al., *Nature* 321: 522 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323 (1988); y Verhoeyen et al., *Science* 239: 1534 (1988)), sustituyendo CDR no humanas o partes de secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente US nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos restos de CDR y algunos restos de FR posibles son sustituidos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. La región bisagra y la región constante de cadena pesada pueden ser de cualquier clase o subclase para obtener un efecto deseado, tal como una función efectora particular.

Con frecuencia, los restos de armazón en las regiones de armazón humanas pueden ser sustituidos por el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, y posiblemente para mejorar, la unión al antígeno. Las sustituciones del armazón se identifican mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, elaborando modelos de las interacciones de los restos de CDR y de armazón para identificar restos de armazón importantes para la unión al antígeno, y mediante comparación de secuencias para identificar restos de armazón inusuales en posiciones particulares; véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 5.585.089; y Riechmann et al., *Nature* 332: 323 (1988).

Se prefiere además que los anticuerpos humanizados retengan alta afinidad por el glucoesfingolípido de tipo I extendido, y retengan o adquieran otras propiedades biológicas favorables. De esta manera, pueden prepararse anticuerpos humanizados por un procedimiento analizando las secuencias precursoras y diversos derivados de anticuerpos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias humanizadas y precursoras. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales hipotéticos están disponibles comúnmente, y son bien conocidos por los expertos en la materia. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de las presentaciones permite el análisis de la función probable de ciertos restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al glucoesfingolípido de tipo I extendido. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse restos de FR del receptor y secuencias introducidas, de modo que la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad incrementada por el antígeno diana, sea aumentada al máximo, aunque son los restos de CDR que directamente y más sustancialmente influyen sobre la unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido. Las regiones CDR pueden ser modificadas también para que contengan uno o más aminoácidos que varían de aquellos obtenidos del anticuerpo precursor del cual se obtuvo la CDR, para proporcionar propiedades de interés mejoradas o diferentes, tales como unión de mayor afinidad o mayor avidéz, por ejemplo.

Ciertas partes de las regiones constantes del anticuerpo pueden ser manipuladas y cambiadas para proporcionar

homólogos, derivados, fragmentos y similares del anticuerpo con propiedades diferentes de o mejores que las observadas en el anticuerpo precursor. De esta manera, por ejemplo, muchos anticuerpos IgG4 forman enlaces disulfuro intracadena cerca de la región de bisagra. El enlace intracadena puede desestabilizar la molécula bivalente precursora, formando moléculas monovalentes que comprenden una cadena pesada con la cadena ligera asociada. Dichas moléculas pueden volver a asociarse, pero sobre una base aleatoria.

Otra serie de aminoácidos adecuados para modificación incluyen aminoácidos en el área de la bisagra que afectan a las funciones del anticuerpo tales como la unión de una molécula que contiene una cadena pesada con unión al receptor F<sub>c</sub> e internalización del anticuerpo unido. Dichos aminoácidos incluyen, en las moléculas de IgG1, los restos de aproximadamente 233 a aproximadamente 237 (Glu-Leu-Leu-Gly-Gly, SEC ID NO: 1); de aproximadamente 252 a aproximadamente 256 (Met-Ile-Ser-Arg-Thr, SEC ID NO: 2) y de aproximadamente 318 (Glu) a aproximadamente 331 (Pro) incluyendo, por ejemplo, Lys<sub>320</sub>, Lys<sub>322</sub> y Pro<sub>329</sub>.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Pueden obtenerse anticuerpos humanos por una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo los métodos de presentación de fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana; véanse las patentes US nº 4.444.887 y 4.716.111; y los documentos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741. Las técnicas de Cole et al. y Boerder et al. están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss (1985); y Boerner et al., *J Immunol* 147:86 (1991)).

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que expresen también ciertos genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada humana pueden ser introducidos aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden ser introducidas en las células madre embrionarias de ratón, además de los genes de la cadena ligera y pesada humanas. Los genes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada de ratón pueden tratarse de modo que sean no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de los loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la supresión homocigótica de la región JH previene la producción endógena de anticuerpos. Las células madre embrionarias modificadas son expandidas y microinyectadas en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos son entonces procreados para producir progenie homocigótica que exprese anticuerpos humanos; véanse, por ejemplo, Jakobovitis et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2551 (1993); Jakobovitis et al., *Nature* 362:255 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol* 7:33 (1993); y Duchosal et al., *Nature* 355:258 (1992)).

Los ratones transgénicos son inmunizados en la forma normal con un glucoesfingolípido de tipo I extendido, por ejemplo la totalidad o una parte del glucoesfingolípido de tipo I extendido, o una preparación de membrana que contenga al mismo. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra el glucoesfingolípido de tipo I extendido pueden obtenerse de los ratones transgénicos inmunizados usando la tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de las células B, y subsiguientemente sufren conmutación de clase y mutación somática. De esta manera, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una revisión, véase Lonberg et al., *Int Rev Immunol* 13: 65-93 (1995). Para una discusión de la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; y EPO nº 0.598.877; y las patentes US nº 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, compañías tales como Amgen (Fremont, CA), Genpharm (San Jose, CA) y Medarex, Inc. (Princeton, NJ) pueden ser contratadas para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra el glucoesfingolípido de tipo I extendido usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

Asimismo, pueden obtenerse mAbs humanos inmunizando ratones trasplantados con leucocitos de sangre periférica, esplenocitos o médula ósea humanos (usando, por ejemplo, la técnica de triomas de XTL Biopharmaceuticals, Israel).

Anticuerpos completamente humanos que reconocen a un epítipo seleccionado pueden generarse usando una técnica referida como "selección guiada". En dicho enfoque, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce al mismo epítipo (Jespers et al., *Bio/Technology* 12: 899 (1988)).

Cuando se usan técnicas recombinantes, la variante de anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o puede ser segregada directamente en el medio. Si la variante de anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los restos de materia en partículas, ya sea células hospedantes o fragmentos lisados, pueden ser eliminados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son segregados hacia el

espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta de células es expuesta a acetato de sodio (pH 3,5) y EDTA. Los restos de células pueden ser eliminados por centrifugación. Cuando la variante de anticuerpo se segrega al medio, el sobrenadante de dichos sistemas de expresión se concentra generalmente primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasas, tal como PMSF, puede incluirse para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpos preparada de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A o la proteína G como un ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de un dominio  $F_c$  de inmunoglobulina que está presente en la variante de anticuerpo. Puede usarse proteína A para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas de IgG1, IgG2 o IgG4 humanas (Lindmark et al., *J Immunol Meth* 62: 1 (1983)). Puede usarse proteína G para isotipos de ratón y para IgG3 humana (Guss et al., *EMBO J* 5: 1567 (1986)). La matriz a la cual el ligando de afinidad se une es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. 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 pueden lograrse con la agarosa. Cuando la variante de anticuerpo comprende un dominio  $C_{H3}$ , la resina Bakerbond ABXTM (JT Baker; Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, como por ejemplo fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina, cromatografía de agarosa sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio están también disponibles, dependiendo del anticuerpo o la variante que se va a recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo o la variante de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2.5 y 4.5, de preferencia realizada a bajas concentraciones de sales (por ejemplo, sal de aproximadamente 0 a 0,25 M).

Además, los anticuerpos de la invención pueden usarse a su vez para generar anticuerpos anti-idiotípicos que "imiten" al glucoesfingolípido de tipo I extendido usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Greenspan et al., *FASEB J* 7: 437 (1989); y Nissinoff, *J Immunol* 147: 2429 (1991)). Por ejemplo, anticuerpos que se unen a e inhiben competitivamente la multimerización y/o la unión de un ligando al glucoesfingolípido de tipo I extendido pueden usarse para generar anti-idiotipos que "imitan" al glucoesfingolípido de tipo I extendido. Dichos anti-idiotipos neutralizantes o fragmentos  $F_{ab}$  de dichos anti-idiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos o de diagnóstico.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tengan especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de unión está dirigida contra el glucoesfingolípido de tipo I extendido, mientras que la otra especificidad puede ser para cualquier otro antígeno, tal como una proteína de la superficie de la célula, receptor, subunidad de receptor, ligando, antígeno específico de tejidos, proteína viral, proteína de cubierta viralmente codificada, agente farmacológicamente activo tal como un fármaco, proteína derivada de bacterias, proteína de la superficie bacteriana, etc.

Los métodos para obtener anticuerpos biespecíficos son bien conocidos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena ligera/cadena pesada de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature* 305: 537 (1983)). Debido al surtido aleatorio de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina, los hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de aproximadamente diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo aproximadamente una podría tener la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra usualmente por etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829 y en Traunecker et al., *EMBO J* 10: 3655 (1991). Otros métodos para obtener anticuerpos biespecíficos se proporcionan, por ejemplo, en Kufer et al., *Trends Biotech* 22: 238-244, 2004.

Los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas pueden ser fusionados con las secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es de preferencia con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Puede tener la primera región constante de cadena pesada ( $C_{H1}$ ) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, son insertados en vectores de expresión separados, y son cotransformados en un organismo hospedante adecuado. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., *Meth Enzym* 121: 210 (1986).

Los anticuerpos heteroconjugados son también contemplados por la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario hacia células no deseadas (patente US nº

4.676.980). Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in vitro usando métodos conocidos en la química de síntesis de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro, o formando un enlace de tioéster. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato, y aquellos descritos, por ejemplo, en la patente US nº 4.676.980.

Además, pueden generarse anticuerpos de dominio individual para el glucoesfingolípido de tipo I extendido. Ejemplos de dicha tecnología se han descrito en el documento W09425591 para anticuerpos derivados de la cadena pesada de inmunoglobulina de camélidos, así como en el documento US20030130496, que describe el aislamiento de anticuerpos completamente humanos de dominio individual de fagotecas.

Alternativamente, pueden ponerse en práctica técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase la patente US nº 4.946.778; y Bird, Science 242:423 (1988); Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:5879 (1988); y Ward et al., Nature 334:544 (1989)). Los anticuerpos monocatenarios se forman enlazando los fragmentos de la cadena ligera y pesada de la región de F<sub>v</sub> por medio de un puente de aminoácidos, que da como resultado un polipéptido monocatenario. Pueden usarse también técnicas para el ensamblaje de fragmentos F<sub>v</sub> funcionales en E. coli (Skerra et al., Science 242: 1038 (1988)). Anticuerpos monocatenarios ("scFv") y un método para su construcción se describen, por ejemplo, en la patente US nº 4.946.778. Como alternativa, pueden construirse fragmentos F<sub>ab</sub>, y pueden ser expresados por medios similares. Todos los anticuerpos total o parcialmente humanos pueden ser menos inmunógenos que los mAbs totalmente murinos, y los fragmentos y anticuerpos monocatenarios pueden ser también menos inmunógenos.

La presente invención comprende anticuerpos fusionados en forma recombinante o químicamente conjugados (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a un polipéptido. Anticuerpos fusionados o conjugados de la presente invención pueden usarse para facilitar la purificación; véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/21232; EP 439.095; Naramura et al., Immunol Lett 39: 91 (1994); patentes US nº 5.474.981; Gillies et al., Proc Natl Acad Sci USA 89: 1428 (1992); y Fell et al., J Immunol 146:2446 (1991).

La purificación puede facilitarse usando un marcador o etiqueta de reconocimiento. Por ejemplo, el marcador puede ser una secuencia de aminoácidos, tal como un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente; Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA 86: 821 (1989). Otras etiquetas de péptidos útiles para purificación incluyen, pero no están limitadas a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell 37: 767 (1984)), y la etiqueta "flag".

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de fagotecas de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature 348:552 (1990). Clarkson et al., Nature 352:624 (1991) y Marks et al., J Mol Biol 222:581 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando fagotecas. Publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (escala en nM) por entremezclado de cadenas (Marks et al., Bio/Technology 10: 779 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación in vivo como una estrategia para construir fagotecas muy grandes (Waterhouse et al., Nucl Acids Res 21: 2265 (1993)). De esta manera, las técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos antiglucoesfingolípido de tipo I extendido candidatos pueden ensayarse mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), FACS, inmunotransferencia Western u otras técnicas inmunoquímicas, como se conoce en la técnica. De esta manera, células B o células que expresen el glucoesfingolípido de tipo I extendido pueden usarse para detectar la unión del anticuerpo a las mismas usando una técnica conocida, o preparaciones de membrana adecuadas que contengan al glucoesfingolípido de tipo I extendido o parte del mismo, o estructuras de cadena tipo I extendidas purificadas o aisladas pueden ser adheridas a una fase sólida y usadas como un elemento de captura en un ensayo, configurado como una elección de diseño.

Para determinar si un homólogo de anticuerpo particular se une al glucoesfingolípido de tipo I extendido humano, puede usarse cualquier ensayo de unión convencional. Ensayos de unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido útiles incluyen análisis por FACS, ensayos ELISA, radioinmunoensayos, y similares, que detectan la unión del anticuerpo, y funciones que resultan de los mismos, al glucoesfingolípido de tipo I extendido humano. Las formas soluble y de longitud completa del glucoesfingolípido de tipo I extendido humano mostradas aquí son útiles en dichos ensayos. La unión de un anticuerpo u homólogo al glucoesfingolípido de tipo I extendido, o a fragmentos solubles del mismo, puede detectarse convenientemente a través del uso de un segundo anticuerpo específico para las inmunoglobulinas de la especie de la cual deriva el anticuerpo u homólogo. El segundo anticuerpo puede llevar un marcador detectable o puede estar configurado para ser detectado.

La capacidad de un anticuerpo u homólogo para unirse al glucoesfingolípido de tipo I extendido humano puede evaluarse poniendo a prueba la capacidad del mismo para unirse a células positivas para el glucoesfingolípido de tipo I extendido humano. Células positivas para el glucoesfingolípido de tipo I extendido adecuadas para su uso para determinar si un anticuerpo u homólogo particular se une al glucoesfingolípido de tipo I extendido humano son las

células de cultivo de tejidos de mamífero disponibles que expresan el glucoesfingolípido de tipo I extendido, tal como sobre la superficie de la célula.

5 La unión del anticuerpo u homólogo a la célula positiva para el glucoesfingolípido de tipo I extendido puede detectarse tiñendo las células con, por ejemplo, un segundo anticuerpo marcado fluorescentemente específico para inmunoglobulinas de la misma especie de la cual deriva el homólogo del anticuerpo que está siendo ensayado. Un clasificador de células activado por fluorescencia ("FACS") puede usarse para detectar y cuantificar cualquier unión; véase, en general, Shapiro, Practical Flow Cytometry, Alan R. Liss, Inc., Nueva York, N.Y. (1985).

10 Para determinar si un anticuerpo u homólogo particular no causa una disminución significativa en el número de células positivas para el glucoesfingolípido de tipo I extendido circulantes in vivo, se cuantifica el número de células positivas para el glucoesfingolípido de tipo I extendido circulantes aisladas de un mamífero dentro de 24 horas después la administración del anticuerpo u homólogo a un mamífero que tenga una función inmunitaria normal, y se compara con el número previo a la administración o el número en un mamífero control a quien se le ha administrado un anticuerpo u homólogo de isotipo comparado de especificidad irrelevante en lugar de un anticuerpo u homólogo de la presente invención. La cuantificación de células positivas para el glucoesfingolípido de tipo I extendido en animales dosificados con un anticuerpo antiglucoesfingolípido de tipo I extendido o parte o derivado funcional del mismo puede lograrse, por ejemplo, tiñendo las células obtenidas con anticuerpos marcados fluorescentemente que se unen a los anticuerpos anti-glucoesfingolípido de tipo I extendido, así como anticuerpos marcados específicos para células T y células B, seguido de análisis por FACS.

15 Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse en términos del epítipo o epítipos o parte o partes del glucoesfingolípido de tipo I extendido a los cuales el anticuerpo reconoce o se une específicamente. El epítipo o epítipos pueden especificarse como se describe en la presente memoria, por ejemplo por medios físicos, tales como espectrometría de masas, análisis de la composición de los sacáridos, las moléculas a las cuales se unen los azúcares, epítipos conformacionales, etc.

20 Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse también en términos de reactividad cruzada. Los anticuerpos que se unen a glucoesfingolípidos tipo I extendidos, que tienen al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% y al menos 50% de identidad (según se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente), glucoesfingolípidos tipo I extendidos también se incluyen en la presente invención.

25 Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse también en términos de la afinidad de unión a un glucoesfingolípido de tipo I extendido de interés. Los anticuerpos antiglucoesfingolípido de tipo I extendido pueden unirse con una  $K_D$  de menos de aproximadamente  $10^{-7}$  M, menos de aproximadamente  $10^{-6}$  M o menos de aproximadamente  $10^{-5}$  M. Afinidades de unión mayores en un anticuerpo de interés pueden ser beneficiosas, tales como aquellas con una constante de disociación en equilibrio o  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-8}$  a aproximadamente  $10^{-15}$  M o más, de aproximadamente  $10^{-8}$  a aproximadamente  $10^{-12}$  M, de aproximadamente  $10^{-9}$  a aproximadamente  $10^{-11}$  M, o de aproximadamente  $10^{-8}$  a aproximadamente  $10^{-10}$  M. La invención también proporciona anticuerpos que inhiben competitivamente la unión de un anticuerpo a un epítipo de la invención, según se determina por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo los inmuoensayos descritos en la presente. En las formas de realización preferidas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión al epítipo en al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60% o al menos 50%.

30 La presente invención incluyen también conjugados que comprenden un anticuerpo de interés. Los conjugados comprenden dos componentes primarios, un anticuerpo de interés y un segundo componente, el cual puede ser un agente de unión a células, un agente citotóxico, un agente farmacológicamente activo, un fármaco, etc.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "agente de unión a células" se refiere a un agente que reconoce y se une específicamente a una molécula sobre la superficie de la célula. De esta manera, el agente de unión a células puede ser aquel que se une a un antígeno de CD, un antígeno de patógeno, tal como un antígeno de virus, un antígeno de diferenciación, un antígeno de cáncer, un antígeno específico de células, un antígeno específico de tejidos, una Ig o molécula similar a Ig, etc.

40 Los agentes de unión a células pueden ser de cualquier tipo como se conocen actualmente, o que serán conocidos, e incluyen péptidos, no péptidos, sacáridos, ácidos nucleicos, ligandos, receptores, etc., o combinaciones de los mismos. El agente de unión a células puede ser cualquier compuesto que pueda unirse a una célula, ya sea de una manera específica o no específica. En general, el agente puede ser un anticuerpo (especialmente anticuerpos monoclonales), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas para el transporte de nutrientes (tal como transferrina), o cualquier otra sustancia o molécula de unión a células.

45 Otros ejemplos de agentes de unión a células que pueden usarse incluyen: anticuerpos policlonales; anticuerpos monoclonales; y fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  y  $F_v$  (Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol. 113: 470-478 (1974); y Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-

244 (1960)).

El segundo componente puede ser también un agente citotóxico. La expresión "agente citotóxico", como se usa en la presente memoria, se refiere a una sustancia que reduce o bloquea la función o el crecimiento de células, y/o que causa la destrucción de las células. De esta manera, el agente citotóxico puede ser un taxol, un maitansinoide tal como DM1 o DM4, CC-1065 o un análogo de CC-1065, una ricina, un fármaco, mitomicina C, etc. En algunas formas de realización, el agente citotóxico, como con cualquier agente de unión de un conjugado de la presente invención, se une covalentemente, directamente o por medio de un enlazador escindible o no escindible, a un anticuerpo de interés.

Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides inhiben la formación de los microtúbulos y son altamente tóxicos para las células de mamífero.

Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado, y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones. Dichos maitansinoides adecuados se describen en las patentes US nº 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados que tienen un anillo aromático modificado incluyen: (1) C-19-descloro (patente US nº 4.256.746) (preparado, por ejemplo, por reducción con LAH de ansamitocina P2); (2) C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo)+/-C-19-descloro (patentes U.S. nº 4.361.650 y 4.307.016) (preparado, por ejemplo, por desmetilación usando Streptomyces o Actinomyces o decoloración usando hidruro de litio y aluminio (LAH)); y (3) C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente U.S. nº 4.294.757) (preparado mediante acilación usando cloruros de acilo).

Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados que tienen modificaciones de otras posiciones incluyen: (1) C-9-SH (patente US nº 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H<sub>2</sub>S o P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>); (2) C-14-alcoximetilo (desmetoxi/CH<sub>2</sub>OR) (patente US nº 4.331.598); (3) C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>2</sub>OAc) (patente US nº 4.450.254) (preparado de Nocardia); (4) C-15-hidroxi/aciloxi (patente U.S. nº 4,364,866) (preparado por la conversión de maitansinol por Streptomyces); (5) C-15-metoxi (patentes US nº 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*); (6) C-18-N-desmetilo (patentes US nº 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por Streptomyces); y (7) 4,5-desoxi (patente de US nº 4.371.533) (preparado por la reducción de maitansinol con LAH/tricloruro de titanio).

Los conjugados citotóxicos pueden prepararse por métodos *in vitro*. Para enlazar un agente citotóxico, fármaco o profármaco al anticuerpo, se usa comúnmente un grupo enlazante. Los grupos enlazantes adecuados se conocen en la técnica, e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas y grupos lábiles a esterases. Por ejemplo, pueden construirse conjugados usando una reacción de intercambio de disulfuro, o formando un enlace de tioéter entre un anticuerpo de interés y el fármaco o profármaco.

La molécula conjugada a un anticuerpo de interés puede ser una molécula con una actividad farmacológica, tal como un fármaco, tal como una pequeña molécula o una biomolécula. De esta manera, la biomolécula puede ser una citocina, por ejemplo. La molécula puede ser un profármaco, tal como un éster de fármaco. La molécula puede ser un radionúclido.

Como se expone anteriormente, la presente invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican un anticuerpo o variante funcional del mismo como se describe en la presente memoria, constructos de vector que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica los polipéptidos de unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido de la presente invención, células hospedantes que comprenden dicho vector, y técnicas recombinantes para la producción del polipéptido que se une a glucoesfingolípidos de tipo I extendidos.

El vector contiene normalmente componentes conocidos en la técnica, e incluyen generalmente, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, un promotor, una secuencia de poliA, uno o más genes marcadores o de selección, secuencias que facilitan y/o aumentan la traducción, un elemento potenciador, etc. De esta manera, los vectores de expresión incluyen una secuencia nucleotídica enlazada operablemente a dichas secuencias nucleotídicas reguladoras de la traducción o transcripción adecuadas, tales como las derivadas de genes de mamíferos, microbianos, de virus o de insectos. Ejemplos de secuencias reguladoras adicionales incluyen operadores, sitios de unión ribosomales del ARNm, y/u otras secuencias adecuadas que controlan la transcripción y traducción, tales como el inicio y la terminación de las mismas. Las secuencias nucleotídicas están "enlazadas operablemente" cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia nucleotídica para el polipéptido adecuado. De esta manera, una secuencia nucleotídica del promotor está enlazada operablemente a, por ejemplo, la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo si la secuencia nucleotídica del promotor controla la transcripción de esa secuencia nucleotídica.

Además, secuencias que codifican péptidos señal adecuados, que no están asociadas naturalmente con las secuencias de la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo, pueden ser incorporadas en los vectores de expresión.



Por ejemplo, una secuencia nucleotídica para un péptido señal (líder secretor) puede ser fusionada en el marco de lectura a la secuencia polipeptídica, de modo que el anticuerpo es segregado al espacio periplásmico o al medio. Un péptido señal que sea funcional en las células hospedantes deseadas aumenta la secreción extracelular del anticuerpo adecuado o parte del mismo. El péptido señal puede ser escindido del polipéptido durante la secreción del anticuerpo de la célula. Ejemplos de dichas señales secretoras son bien conocidos, e incluyen, por ejemplo, los descritos en las patentes US nº 5.698.435; 5.698.417; y 6.204.023.

El vector puede ser un plásmido, un vector viral monocatenario o bicatenario, un vector fágico de ADN o ARN monocatenario o bicatenario, un fagémido, un cósmido, o cualquier otro vehículo de un transgen de interés. Dichos vectores pueden ser introducidos en las células como polinucleótidos por técnicas bien conocidas para la introducción de ADN y ARN en las células. Los vectores, en el caso de vectores virales y de fagos, pueden ser introducidos también en las células como virus empaquetado o encapsulado, o una partícula similar a un virus, por técnicas bien conocidas para infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes para la replicación o defectuosos para la replicación. En el último caso, la propagación viral ocurrirá generalmente solo en células hospedantes complementarias y usando vectores plurales que posean los diversos componentes del virus necesarios para producir una partícula. Los sistemas de traducción libres de células pueden usarse también para producir la proteína usando los ARN derivados de las presentes constructos de ADN de interés (véanse, por ejemplo, los documentos WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente US nº 5,122,464).

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser expresados a partir de cualquier célula hospedante adecuada. Los ejemplos de células hospedantes útiles en la presente invención incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas, e incluyen, pero no están limitadas a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*, así como bacilos, *Pseudomonas* y *Streptomyces*) transformadas con ADN recombinante de bacteriófagos, vectores de expresión de ADN plasmídico o de ADN cosmídico que contienen las secuencias codificantes del anticuerpo de interés; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Trichoderma*, *Neurospora*, y hongos filamentosos tales como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, *Baculovirus*) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; o virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293 o 3T3) que alojan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; o el promotor 7.5 K del virus de la vacuna).

Los vectores de expresión para uso en células hospedantes procariotas comprenden generalmente uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos. Un gen marcador seleccionable fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que proporciona un requisito autotrófico. Los ejemplos de vectores de expresión útiles para células hospedantes procariotas incluyen los derivados de plásmidos comercialmente disponibles, tales como pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI), pET (Novagen, Madison, WI) y la serie de vectores pRSET (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Studier, *J Mol Biol* 219: 37 (1991); y Schoepfer, *Gene* 124: 83 (1993)). Secuencias promotoras usadas comúnmente para vectores de expresión de células hospedantes procariotas recombinantes incluyen T7 (Rosenberg et al., *Gene* 56: 125 (1987)), ( $\beta$ -lactamasa (penicilinas), el promotor de lactosa (Chang et al., *Nature* 275: 615 (1978); y Goeddel et al., *Nature* 281: 544 (1979)), el sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel et al., *Nucl Acids Res* 8: 4057 (1980)), y el promotor *tac* (Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

Los vectores de levadura contendrán con frecuencia un origen de la secuencia de replicación, tal como de un plásmido de levadura de 2 $\mu$ , una secuencia que se replica autónomamente (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción y un gen marcador seleccionable. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman et al., *J Biol Chem* 255: 2073 (1980)) u otras enzimas glucolíticas (Holland et al., *Biochem* 17: 4900 (1978)) tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucoasa isomerasa y glucocinasa. Otros vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levaduras se describen además en Fleer et al., *Gene* 107: 285 (1991). Otros promotores y vectores adecuados para levaduras y protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos en la técnica. Los protocolos de transformación de levaduras son bien conocidos. Uno de dichos protocolos es descrito por Hinnen et al., *Proc Natl Acad Sci* 75: 1929 (1978), que selecciona transformantes positivos para Trp en un medio selectivo.

Cualquier cultivo de células eucariotas es viable, ya sea de cultivo de vertebrados o invertebrados. Los ejemplos incluyen células de plantas y de insectos (Luckow et al., *Bio/Technology* 6: 47 (1988); Miller et al., *Genetic*

Engineering, Setlow et al., eds., vol. 8, p. 277-9, Plenum Publishing (1986); y Maeda et al., Nature 315: 592 (1985)). Por ejemplo, pueden usarse sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas. En un sistema de insectos, puede usarse el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el anticuerpo puede ser clonada bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedrina). Otros hospedantes que se han identificado incluyen *Aedes*, *Drosophila melanogaster* y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para transfección está disponible públicamente, por ejemplo la variante L-1 del AcNPV y la cepa Bm-5 del NPV de *Bombyx mori*. Además, cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, algas, lenteja de agua y tabaco pueden usarse también como hospedantes, como es conocido en la técnica.

Las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados, en cultivo (cultivo de tejidos) pueden ser un procedimiento habitual, aunque existen líneas de células exigentes que requieren, por ejemplo, un medio especializado con factores únicos, células nutricias, etc.; véase *Tissue Culture*, Kruse et al., eds., Academic Press (1973). Ejemplos de líneas de células hospedantes de mamífero útiles son células de riñón de mono; células de riñón embrionario humano; células de riñón de cría de hámster; células de ovario de hámster chino (CHO, Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón; células de carcinoma cervical humano (por ejemplo, HeLa); células de riñón canino; células de pulmón humano; células de hígado humano; células de tumor mamario de ratón; y células NSO.

Las células hospedantes son transformadas con vectores para la producción de anticuerpos, y se cultivan en un medio nutriente convencional que contenga factores de crecimiento, vitaminas, minerales, etc., así como inductores adecuados para las células y vectores usados. Las secuencias promotoras y secuencias potenciadoras usadas comúnmente derivan, por ejemplo, del virus del poliovirus, adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano (CMV). Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40 pueden usarse para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia de gen estructural en una célula hospedante de mamífero, por ejemplo origen de SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, sitios de empalme y de poliadenilación. Los promotores temprano y tardío virales son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente de un genoma viral como un fragmento que puede contener también un origen de replicación viral. Los ejemplos de vectores de expresión para uso en células hospedantes de mamífero están disponibles comercialmente.

Los medios disponibles comercialmente, tales como F10 de Ham, medio esencial mínimo (MEM), RPMI-1640 y medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), son adecuados para el cultivo de células hospedantes. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth Enzymol 58: 44 (1979) y Barnes et al., Anal Biochem 102: 255 (1980), y en las patentes U.S. nº 4.767.704; 4.657.866; 4.560.655; 5.122.469; 5.712.163; o 6.048.728, puede usarse como un medio de cultivo para las células hospedantes. Cualquiera de dichos medios puede ser complementado, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruros, tales como cloruro de sodio, de calcio o de magnesio; y fosfatos), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, oligoelementos (que pueden definirse como compuestos inorgánicos presentes usualmente a concentraciones finales en la escala micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario puede incluirse a concentraciones adecuadas, como una elección de diseño. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son adecuadas como se conocen en la técnica para la célula, y para permitir la expresión deseada del transgen.

Los polinucleótidos de interés pueden obtenerse, y la secuencia nucleotídica de los polinucleótidos puede determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia nucleotídica del anticuerpo, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., Bio/Techniques 17: 242 (1994)), y amplificando entonces los oligonucleótidos ligados, por ejemplo por PCR.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir del ácido nucleico de una célula que expresa el mismo. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede obtenerse de una fuente adecuada, tal como una biblioteca, la cual puede ser específica para células que producen anticuerpos, tales como células de hibridoma seleccionadas para que expresen un anticuerpo de la invención. Los cebadores adecuados pueden ser configurados para la amplificación por PCR. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden ser clonados entonces en vectores de clonación replicables usando cualquier método conocido en la técnica.

Una vez que se determinan la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, la secuencia nucleotídica del anticuerpo puede manipularse para obtener los equivalentes de interés descritos en la presente memoria, usando métodos conocidos en la técnica para manipular secuencias nucleotídicas, por ejemplo técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR etc. (véanse, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990); y Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998)), para generar anticuerpos que tengan una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, supresiones y/o inserciones de

aminoácidos.

- 5 La secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera y/o pesada puede inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDR por métodos bien conocidos, por ejemplo por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de la cadena ligera y pesada, para determinar las regiones de hipervariabilidad de la secuencia. Mediante el uso de técnicas de ADN recombinante habituales, una o más de las CDR pueden ser insertadas dentro de las regiones de armazón, por ejemplo en las regiones de armazón humanas para humanizar un anticuerpo no humano, como se describe anteriormente. El polinucleótido de interés generado por la combinación de las regiones de armazón y una o más CDR codifica una molécula que se une específicamente al glucoesfingolípido de tipo I extendido, o al menos a los epítomos de hidrato de carbono y la estructura reconocida por el mismo. Por ejemplo, dichos métodos pueden usarse para realizar sustituciones o supresiones de aminoácidos de uno o más restos de cisteína que participan en un enlace de disulfuro intracadena para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces de disulfuro intracadena.
- 10
- 15 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención pueden usarse para detectar el glucoesfingolípido de tipo I extendido, y por lo tanto células que expresan el glucoesfingolípido de tipo I extendido, en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización, el anticuerpo antiglucoesfingolípido de tipo I extendido de la invención se usa para determinar la presencia y el nivel del glucoesfingolípido de tipo I extendido en un tejido o en células derivadas del tejido. Los niveles del glucoesfingolípido de tipo I extendido en el tejido o biopsia pueden determinarse, por ejemplo, en un inmunoensayo con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. El tejido o la biopsia del mismo pueden ser congelados o fijados. Puede usarse el mismo método u otros métodos para determinar otras propiedades del glucoesfingolípido de tipo I extendido, tales como el nivel del mismo, su localización celular, etc.
- 20
- 25 El método descrito anteriormente puede usarse, por ejemplo, para diagnosticar un cáncer en un sujeto que se sabe que padece o que se sospecha que padece un cáncer, en el que el nivel del glucoesfingolípido de tipo I extendido medido en dicho paciente se compara con el de un estándar o sujeto de referencia normal.
- 30 La presente invención proporciona además anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a epítomo de los mismos, que además se marcan para su uso en aplicaciones de investigación o de diagnóstico. En algunas formas de realización, el marcador es un marcador radiactivo, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de formación de imágenes o un ión de metal, por ejemplo.
- 35 Se proporciona también un método de diagnóstico en el cual dichos anticuerpos marcados o fragmentos de unión a epítomo de los mismos se administran a un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer, artritis, enfermedades autoinmunes u otras enfermedades relacionadas con, causadas por, o asociadas con la expresión y/o función del glucoesfingolípido de tipo I extendido, y se mide o se monitoriza la distribución del marcador dentro del cuerpo del sujeto.
- 40 El anticuerpo y fragmentos del mismo de la presente invención pueden usarse como agentes de purificación por afinidad. En dicho procedimiento, los anticuerpos son inmovilizados sobre una fase sólida, tal como un dextrano o agarosa, resina o papel filtro, usando métodos conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado es puesto en contacto con una muestra que contiene glucoesfingolípido de tipo I extendido o células que lo portan a purificar, y después el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el glucoesfingolípido de tipo I extendido o célula a purificar, que está unido al anticuerpo inmovilizado de interés. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el glucoesfingolípido de tipo I extendido o célula del anticuerpo de interés.
- 45
- 50 Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo de interés se marcará típicamente con un marcador o resto detectable. Numerosos marcadores están disponibles, las cuales pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías: (a) radioisótopos, tales como  $^{36}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$  (el anticuerpo puede ser marcado con el radioisótopo usando una técnica descrita, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, vol. 12, Coligen et al., ed., Wiley-Interscience, Nueva York (1991), y la radiactividad puede medirse usando recuento de centelleo); (b) marcadores fluorescentes, tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio), fluoresceína y derivados de la misma, rodamina y derivados de la misma, dansilo, lisamina, ficoeritrina y rojo Texas, pudiéndose conjugar los marcadores fluorescentes al anticuerpo usando una técnica descrita en *Current Protocols in Immunology*, más arriba, por ejemplo, en el que la fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro; y (c) diversos marcadores de sustratos enzimáticos están disponibles (la patente US nº 4.275.149 proporciona una revisión), catalizando generalmente la enzima una alteración química de un sustrato cromógeno la cual puede medirse usando diversas técnicas, por ejemplo la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, el cual puede medirse espectrofotométricamente, o la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Se conocen técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia, por ejemplo usando un luminómetro, o el marcador dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente US nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y
- 55
- 60
- 65

glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan et al., Meth Enz, ed. Langone y Van Vunakis, Academic Press, Nueva York, 73 (1981).

5 Cuando se usan dichos marcadores, existen sustratos adecuados tales como: (i) para peroxidasa de rábano picante con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, en el que la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o hidrocloreto de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)); (ii) para fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de p-nitrofenilo como el sustrato cromógeno; y (iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromógeno (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o un sustrato fluorógeno tal como 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa.

Otras combinaciones de enzima-sustrato están disponibles para los expertos en la materia. Para una revisión general, véanse las patentes US nº 4.275.149 y 4.318.980.

15 A veces, el marcador está conjugado indirectamente al anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar conjugado con biotina, y cualquiera de los informadores mencionados anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y, de esta manera, el marcador puede ser conjugado con el anticuerpo en esa manera indirecta. En la técnica se conocen diversas avidinas. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta del marcador, el anticuerpo puede conjugarse con un pequeño hapteno (por ejemplo, digoxina), y uno de los diferentes tipos de marcadores o informadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo antidigoxina. De esta manera, la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo o muteína puede lograrse usando un segundo anticuerpo.

25 En otra forma de realización de la invención, el anticuerpo no necesita ser marcado, y la presencia del mismo puede detectarse usando un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo, otra forma de un segundo anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en cualquier método de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987).

30 Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un estándar marcado para competir con la muestra de ensayo para unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de antígeno en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que llega a unirse a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que llega a unirse, los anticuerpos son generalmente insolubilizados antes o después de la competición. Como resultado, el estándar y la muestra de ensayo que se unen a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del estándar y la muestra de ensayo que permanecen no unidos.

40 Los ensayos de sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una diferente parte inmunógena, determinante o epítipo, de la diana que a detectar. En el ensayo de sándwich, la muestra de ensayo que va a ser analizada se une por un primer anticuerpo que es inmovilizado directa o indirectamente sobre un soporte sólido, y después un segundo anticuerpo marcado directa o indirectamente se une a la muestra de ensayo unida, formando de esta manera un complejo de tres partes insoluble; véase, por ejemplo, la patente US nº 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar él mismo marcado con un resto detectable (ensayo de sándwich directo), o puede medirse usando un anticuerpo antiinmunoglobulina u otro miembro adecuado del par de unión (anticuerpo/antígeno, receptor/ligando, enzima/sustrato, por ejemplo) que está marcado 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.

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

Los anticuerpos pueden usarse también para ensayos de diagnóstico in vivo. En general, el anticuerpo o variante del mismo se marca con un radionúclido (tal como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ ), de modo que los sitios que expresan el glucoesfingolípido de tipo I extendido pueden localizarse usando, por ejemplo, inmunoescintigrafía y una cámara gamma.

60 La presente invención incluye también kits, por ejemplo, que comprenden un anticuerpo, fragmento del mismo, homólogo, derivado del mismo, etc., tal como un conjugado citotóxico o marcado, e instrucciones para el uso del anticuerpo, conjugado para la destrucción o marcaje de tipos de células particulares, etc. Las instrucciones pueden incluir directrices para el uso del anticuerpo, conjugado, etc., *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. El anticuerpo puede estar en forma líquida o como un sólido, generalmente liofilizado. El kit puede contener otros reactivos adecuados, tales como un tampón, una disolución reconstituíble y otros ingredientes necesarios para el uso deseado. Se contempla una combinación de reactivos empaquetados, en cantidades predeterminadas con instrucciones para el uso de los mismos, tal como para un uso terapéutico para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado, tal como con una enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros

aditivos, tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis), y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden hacerse variar para proporcionar concentrados de una disolución de un reactivo, lo cual le proporciona al usuario flexibilidad, economía de espacio, economía de reactivos, etc. Los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, usualmente liofilizados, incluyendo excipientes, que tras la disolución proporcionan una disolución de reactivo que tiene la concentración adecuada.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar un mamífero. En una forma de realización, el anticuerpo o equivalente de interés se administra a un mamífero no humano con el fin de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Los ejemplos de mamíferos no humanos que se deben tratar incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en los cuales se llevan a cabo estudios preclínicos. Dichos mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad a tratar con el anticuerpo, o pueden usarse para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas formas de realización, pueden realizarse estudios de aumento de escala de la dosis en el mamífero. El producto de interés puede tener también uso terapéutico en dichos animales.

Un anticuerpo, con o sin un segundo componente, tal como un resto terapéutico conjugado al mismo, administrado solo o en combinación con un factor o factores citotóxicos, puede usarse como un agente terapéutico. La presente invención está dirigida a terapias basadas en anticuerpos que implican administrar los anticuerpos de la invención a un animal, un mamífero o un ser humano, para tratar una enfermedad, trastorno o afección asociada con o mediada por el glucoesfingolípidido de tipo I extendido. El animal o sujeto puede ser un mamífero que necesita un tratamiento particular, tal como un mamífero que ha sido diagnosticado con un trastorno particular, por ejemplo uno que se relaciona con el glucoesfingolípidido de tipo I extendido, o que está asociado con la expresión y función de la estructura de cadena de tipo I extendida anormal. Los anticuerpos dirigidos contra el glucoesfingolípidido de tipo I extendido son útiles, por ejemplo, para la profilaxis o el tratamiento de cáncer y trastornos autoinmunes, por ejemplo. Por ejemplo, administrando una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo antiglucoesfingolípidido de tipo I extendido de la presente invención, o un cóctel de una pluralidad de los presentes anticuerpos o equivalentes de los mismos, o en combinación con otros anticuerpos de fuentes variables, o en combinación con un fármaco no de anticuerpo, tal como un fármaco antiinflamatorio, un agente citotóxico, un antibiótico, etc., tal como un fármaco de platino, metotrexato, etc., pueden mejorarse o prevenirse los síntomas de enfermedad en el mamífero tratado, en particular seres humanos.

Los compuestos terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos, equivalentes y derivados de los mismos, como se describe en la presente) y ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención como se describe en la presente memoria (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos) y anticuerpos antiidiotípicos como se describe en la presente. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la expresión y/o actividad aberrantes del glucoesfingolípidido de tipo I extendido, incluyendo, pero no sin limitarse a, cualquiera de uno o más de los trastornos, enfermedades o afecciones descritas en la presente. El tratamiento y/o la prevención de los trastornos, enfermedades o afecciones asociadas con la expresión y/o actividad aberrantes del glucoesfingolípidido de tipo I extendido incluyen, pero no están limitados a, el alivio de al menos un síntoma asociado con dichos trastornos, enfermedades o afecciones. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables como es sabido en la técnica o como se describe en la presente. La expresión "fisiológicamente aceptable", "farmacológicamente aceptable", "farmacéuticamente aceptable", etc., significa aprobado por una agencia normativa del gobierno federal o un gobierno estatal, o listado en la U.S. Pharmacopeia u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y más particularmente en seres humanos.

El anticuerpo antiglucoesfingolípidido de tipo I extendido puede administrarse a un mamífero en cualquier manera aceptable. Los métodos de introducción incluyen, pero no están limitados a, las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, epidural, por inhalación y oral, y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. Los anticuerpos o las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.), y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos terapéuticos o composiciones de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. Además, el anticuerpo puede administrarse convenientemente por infusión pulsátil, en particular con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación se administra por inyección, preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o crónica.

Se conocen otros diversos sistemas de suministro, y pueden usarse para administrar un anticuerpo de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, encapsulamiento en liposomas, micropartículas, microcápsulas, etc. (véase Langer, Science 249: 1527 (1990)); expresión de un anticuerpo, muteína del mismo o parte de unión a antígeno del mismo, de interés en un liposoma, partícula, cápsula, etc., para dar un vehículo de selección de la diana; Treat et al.,

en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein et al., eds., p. 353-365 (1989); y Lopez-Berestein, *ibid.*, p. 317-327; células recombinantes capaces de expresar el compuesto; véase, por ejemplo, Wu et al, *J Biol Chem* 262: 4429 (1987); construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector; etc.

5 Los principios activos pueden ser atrapados también en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de polimetacrilato de metilo, respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en  
10 macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, A. Osal, ed. (1980). Cuando el liposoma o partícula expresa un anticuerpo de interés, cualquiera de una variedad de compuestos puede ser portado en el liposoma, tal como un fármaco no de anticuerpo, fármaco de pequeña molécula, etc. El presente anticuerpo puede cumplir de esta manera una función de selección de diana,

15 También puede usarse la administración pulmonar, por ejemplo, por el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. El anticuerpo puede administrarse también a los pulmones de un paciente en la forma de una composición de polvo seco; véase, por ejemplo, la patente US nº 6.514.496.

20 En una forma de realización específica, puede ser deseable administrar los anticuerpos o composiciones terapéuticas de la invención localmente al área que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a título de limitación, por infusión local, aplicación tópica, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como fibras o membranas sialásticas. Preferentemente, cuando se administra un anticuerpo de la invención, se tiene cuidado de usar materiales a los cuales la proteína no se absorba o adsorba.

25 En todavía otra forma de realización, el anticuerpo puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una forma de realización, puede usarse una bomba (véase Langer, *Science* 249: 1527 (1990); Sefton, *CRC Crit Ref Biomed Eng* 14: 201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88: 507 (1980); y Saudek et al., *N Engl J Med* 321: 574 (1989)). En otra forma de realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer et al., eds., CRC Press (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen et al., eds., Wiley (1984); y Ranger et al., *J Macromol Sci Rev Macromol Chem* 23: 61 (1983); véase también Levy et al., *Science* 228: 190 (1985); During et al., *Ann Neurol* 25: 351 (1989); y Howard et al., *J Neurosurg* 71: 105 (1989)). En todavía otra forma de realización, un sistema de liberación controlada puede ponerse en proximidad de la diana terapéutica.

35 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen al anticuerpo, matrices las cuales están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o matrices. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(alcohol  
40 vinílico), polilactidas (patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, copolímeros etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables (tales como microesferas inyectables compuestas de copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de las moléculas durante alrededor de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más cortos. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización, dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, sustituyendo aminoácidos, y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas.

50 Las formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo pueden prepararse para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas mezclando el polipéptido que tenga el grado deseado de pureza con vehículos, diluyentes, excipientes o estabilizantes "farmacéuticamente aceptables" opcionales usados típicamente en la técnica, es decir, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos diversos; véase Remington's Pharmaceutical Sciences, decimosexta ed., Osol, ed. (1980). Dichos aditivos son generalmente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones usadas; por lo tanto, los excipientes, diluyentes, vehículos, etc., son farmacéuticamente aceptables.

60 Un anticuerpo "aislado" o "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente celular o tisular o medio del cual deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular", incluye preparaciones de un anticuerpo en las cuales el polipéptido/proteína se separa de los componentes celulares de las células de las cuales los mismos se aíslan o se producen de forma recombinante.  
65 de esta manera, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones del anticuerpo que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 2,5% o 1% (en peso seco) de proteína contaminante o

material celular o subcelular. Cuando el anticuerpo se produce de forma recombinante, está también preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10%, 5%, 2,5% o 1% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el anticuerpo se produce por síntesis química, está de preferencia sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos y reactivos, es decir, el anticuerpo de interés está separado de precursores químicos u otros compuestos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por lo tanto, dichas preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% o 1% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una forma de realización preferida de la presente invención, los anticuerpos están aislados o purificados.

Como se utiliza en la presente memoria, la frase “niveles de agregación de bajos a indetectables” se refiere a muestras que contienen no más de 5%, no más de 4%, no más de 3%, no más de 2%, no más de 1% y con frecuencia no más de 0,5% de agregación del anticuerpo o variante del mismo, es decir, dos o más moléculas de anticuerpo o variantes del mismo unidas o unidas juntas, por peso de proteína, según se mide, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC).

Como se utiliza en la presente memoria, el término “niveles de fragmentación de bajos a indetectables” se refiere a muestras que contienen igual a o más de 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de molécula de anticuerpo intacta o variante de la misma, de la proteína total, por ejemplo, en un pico individual, según se determina por HPSEC, o en dos (2) picos (cadena pesada y cadena ligera), por ejemplo, por electroforesis en gel capilar reducida (rCGE), y no conteniendo otros picos individuales que tengan más de 5%, más de 4%, más de 3%, más de 2%, más de 1% o más de 0,5% de la proteína total, cada uno. La rCGE, como se usa en la presente memoria, se refiere a la electroforesis en gel capilar bajo condiciones reductoras suficientes para reducir los enlaces de disulfuro en un anticuerpo o molécula tipo anticuerpo o derivada de anticuerpo.

La presente invención proporciona unos métodos para preparar formulaciones líquidas del anticuerpo o fragmento de unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido del mismo, comprendiendo dichos métodos concentrar una fracción de anticuerpo purificado hasta una concentración final de aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 300 mg/ml o más usando, por ejemplo, una membrana semipermeable con un corte de peso molecular (mw) adecuado (por ejemplo, un corte de 30 kD para fragmentos de  $F_{(ab)2}$  del mismo; y un corte de 10 kD para fragmentos de  $F_{ab}$ ) y, opcionalmente, diafiltrando la fracción de anticuerpo concentrada en el tampón de la formulación usando la misma membrana.

Además, la presente invención comprende asimismo formulaciones líquidas estables de los productos de interés que pueden tener una vida media mejorada *in vivo*. De esta manera, el anticuerpo de interés tiene una vida media en un sujeto, preferentemente un ser humano, de más de 3 días, más de 7 días, más de 10 días, más de 15 días, más de 25 días, más de 30 días, más de 35 días, más de 40 días, más de 45 días, más de 2 meses, más de 3 meses, más de 4 meses, más de 5 meses, o más.

Como se utiliza en la presente memoria, los términos “estabilidad” y “estable”, en el contexto de una formulación líquida que comprende un anticuerpo anti-glucoesfingolípido de tipo I extendido o fragmento de unión del mismo, se refieren a la resistencia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en la formulación al despliegue térmico y químico, agregación, degradación o fragmentación bajo condiciones dadas de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. Las formulaciones “estables” de la invención retienen una actividad biológica igual o mayor que 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,5% bajo condiciones dadas de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. La estabilidad de dicha preparación de anticuerpo puede evaluarse por los grados de agregación, degradación o fragmentación por métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitarse a, rCGE, electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio y poli(acrilamida) (SDS-PAGE) y HPSEC, en comparación con una referencia, durante un período de tiempo predeterminado bajo condiciones de almacenamiento seleccionadas, como una elección de diseño.

La presente invención comprende unas formulaciones líquidas que tienen estabilidad a las temperaturas encontradas en un refrigerador o congelador comercial encontrado en el consultorio de un médico o en un laboratorio, tales como de aproximadamente -20°C a aproximadamente 5°C, evaluándose dicha estabilidad, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC), con fines de almacenamiento, tales como durante aproximadamente 60 días, durante aproximadamente 120 días, durante aproximadamente 180 días, durante aproximadamente un año, durante aproximadamente 2 años, o más. Las formulaciones líquidas de la presente invención exhiben también estabilidad, según se evalúa, por ejemplo, por HSPEC, a temperatura ambiente, durante al menos unas cuantas horas, tal como aproximadamente una hora, aproximadamente dos horas o aproximadamente tres horas, antes de su uso.

El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra la formulación terapéutica. Dichos vehículos fisiológicos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, aceite animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite

de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares. El agua es un vehículo adecuado cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol pueden usarse también como vehículos líquidos, en particular para disoluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, greda, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares. Si se desea, la composición puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Las composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, depósitos, y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc., saborizantes, colorantes, odorantes, etc. Los ejemplos de vehículos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad efectiva del anticuerpo, de preferencia en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo, para proporcionar la forma para administración adecuada al paciente. Como es sabido en la técnica, la formulación se preparará para adecuarse al modo de administración.

Los agentes tamponantes ayudan a mantener el pH en un intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas o condiciones que llevan a la estabilidad del anticuerpo. Los tampones están presentes de preferencia a una concentración que oscila de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tamponantes adecuados para su uso con la presente invención, incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos, y sales de los mismos tales como, por ejemplo, tampones de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), tampones de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico-gluconato de potasio, etc.), tampones de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), tampones de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y tampones de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato de sodio, mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Pueden usarse tampones de fosfato, tampones de carbonato, tampones de histidina, sales de trimetilamina tales como Tris, HEPES y otros de dichos tampones conocidos.

Los conservantes pueden añadirse para retardar el crecimiento microbiano, y pueden añadirse en cantidades que varían de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 1% (en p/v). Los conservantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencil amonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio, alquilparabenos tales como metilparabeno o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.

Los isotonicantes están presentes para garantizar la isotonicidad fisiológica de las composiciones líquidas de la presente invención, e incluyen alcoholes de azúcar polihidroxilados tales como alcoholes de azúcar trihidroxilados o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los alcoholes polihidroxilados pueden estar presentes en una cantidad de entre aproximadamente 0,1% a aproximadamente 25%, en peso, preferentemente aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los otros ingredientes.

Los estabilizantes se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función desde un agente para dar volumen hasta un aditivo que solubiliza al agente terapéutico, o ayuda a prevenir la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihidroxilados; aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquirosa, arabitol, eritritol, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol, y similares, incluyendo ciclitoles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatióna, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol,  $\alpha$ -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (es decir, <10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, sacáridos, monosacáridos tales como xilosa, manosa, fructosa y glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa y sacarosa; trisacáridos tales como rafinosa; polisacáridos tales como dextrano, etc. Los estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10.000 p/p por parte de proteína activa.

Los excipientes diversos adicionales pueden incluir agentes para proporcionar volumen (por ejemplo, agar, gelatina, almidón, etc.), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina o



vitamina E) y co-disolventes.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “agente tensioactivo” se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas, a saber, están compuestos de grupos de tendencias de solubilidad opuestas, típicamente una cadena de hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los agentes tensioactivos pueden clasificarse, dependiendo de la carga del resto tensioactivo, en agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los agentes tensioactivos se usan con frecuencia como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos tales como aquellas discutidas en la presente.

Agentes tensioactivos no iónicos o detergentes (conocidos también como “agentes humectantes”), pueden añadirse para ayudar a solubilizar al agente terapéutico, así como para proteger a la proteína terapéutica contra la agregación inducida por la agitación, lo cual permite también que la formulación sea expuesta a esfuerzos superficiales de cizallamiento, sin que cause desnaturalización de la proteína. Agentes tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), poloxámeros (184, 188, etc.), polioles Pluronic® y monoéteres de polioxietilensorbitán (TWEEN-20®, TWEEN-80®, etc.). Los agentes tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferentemente aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Como se utiliza en la presente memoria, La expresión “sal inorgánica” se refiere a cualquier compuesto, que no contiene carbono, que resulta de la sustitución de parte o la totalidad del hidrógeno ácido o un ácido por un metal o un grupo que actúa como un metal, y se usa con frecuencia como un compuesto para el ajuste de tonicidad en composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Las sales inorgánicas más comunes son NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, etc.

La presente invención proporciona formulaciones líquidas de un compuesto de unión al glucoesfingolípido de tipo I extendido o fragmento del mismo, con un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, o aproximadamente 5,5 a 6,5, o aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2, o aproximadamente 6,0.

La formulación en la presente memoria puede contener también más de un compuesto activo, según sea necesario, para la indicación particular que está siendo tratada, de preferencia aquellos con actividades complementarias que no influyen de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente inmunosupresor. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son efectivas para el fin pretendido. La formulación puede contener también otro fármaco, o una pequeña molécula, un agente farmacológico tal como un fármaco antineoplásico tal como cisplatino.

La expresión “pequeña molécula” y expresiones análogas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, compuestos orgánicos, agentes farmacológicamente activos tales como fármacos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, incluyendo compuestos heteroorgánicos y/u organometálicos) que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

De esta manera, en el caso de cáncer, los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos de tratamientos del cáncer, incluyendo agentes quimioterapéuticos convencionales (paclitaxel, carboplatino, cisplatino y doxorubicina), agentes anti-EGFR (gefitinib, erlotinib y cetuximab), agentes antiangiogénesis (bevacizumab y sunitinib), así como agentes inmunomoduladores tales como interferón- $\alpha$  y talidomida.

Como se utilizan en la presente memoria, Las expresiones “agente terapéutico” y “agentes terapéuticos” se refieren a cualquier agente que puede usarse en el tratamiento, manejo o mejora de una enfermedad, trastorno, malestar y similares, asociados con la expresión, el metabolismo en general y la actividad aberrantes del glucoesfingolípido de tipo I extendido. También se incluyen compuestos conocidos con un efecto farmacológico en el tratamiento de un trastorno, etc., que está asociado con la expresión, el metabolismo y la actividad aberrantes del glucoesfingolípido de tipo I extendido.

El anticuerpo o variante, opcionalmente, se formula con uno o más agentes usados comúnmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento, y de otros factores discutidos anteriormente. Éstos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con las vías de administración que se usaron anteriormente, o de aproximadamente 1 a 99% de las dosificaciones usadas aquí hasta ahora.

Las formulaciones que se usarán para administración in vivo deben ser estériles. Esto puede lograrse, por ejemplo,

por filtración a través de membranas de filtración estéril. Por ejemplo, las formulaciones líquidas de la presente invención pueden esterilizarse por filtración usando un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  o un filtro de 022  $\mu\text{m}$ .

Además, los anticuerpos de la presente invención pueden ser conjugados con varias moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas; véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente US nº 5.314.995; y el documento EPO 396.387. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede ser conjugado a un resto terapéutico tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un ion de metal radioactivo (por ejemplo, emisores alfa tales como, por ejemplo,  $^{213}\text{Bi}$ ). Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo y decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucina, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisplatino (cis-diclorodiamino platino (II) (DDP)), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina, daunomicina y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, actinomicina, bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Para prolongar la circulación de un anticuerpo *in vivo* en suero, pueden usarse diversas técnicas. Por ejemplo, moléculas de polímero inertes, tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular, pueden ser unidas a un anticuerpo con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de conjugación específica de sitio del PEG al término N o al término C del anticuerpo, o por medio de grupos  $\epsilon$  amino presentes en los restos de lisina. Puede usarse derivación de polímeros lineales o ramificados que da resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede monitorizarse estrechamente por SDS-PAGE y espectrometría de masas, para garantizar la conjugación adecuada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG sin reaccionar puede separarse de los conjugados de anticuerpo-PEG por cromatografía de exclusión por tamaño o por cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivados con PEG pueden ensayarse para determinar la actividad de unión así como para determinar la eficacia *in vivo* usando métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo por los inmunoensayos descritos en la presente.

Un anticuerpo que tenga una vida media incrementada *in vivo* puede generarse también introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o supresiones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcR del mismo (tal como un fragmento de dominio de Fc o fragmento de dominio de Fc bisagra); véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/23289; WO 97/34631; y la patente US nº 6.277.375.

Además, un anticuerpo puede conjugarse a albúmina para obtener un anticuerpo más estable *in vivo*, o para que tenga una vida media *in vivo* más larga. Las técnicas se conocen en la técnica; véanse, por ejemplo, los documentos WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y EPO 413622. El anticuerpo puede ser modificado también, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc.

Las técnicas para conjugar dicho resto terapéutico a anticuerpos son bien conocidas; véanse, por ejemplo, Arnon et al., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), Alan R. Liss (1985); Hellstrom et al., en *Controlled Drug Delivery*, 2ª ed., Robinson et al., eds., Marcel Dekker (1987); Thorpe, en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al., eds. (1985); *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*, Baldwin et al., eds., Academic Press (1985); y Thorpe et al., *Immunol Rev* 62:119 (1982). Como alternativa, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo, tal como un anticuerpo bifuncional; véase, por ejemplo, la patente US nº 4.676.980.

Los conjugados de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y no se considerará que el agente terapéutico o resto farmacéutico se limita a los agentes quimioterapéuticos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacéutico puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , AIM I (documento WO 97/33899), AIM II (documento WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., *Int Immunol*, 6:1567 (1994)), VEGF (documento WO 99/23105); un agente trombotico; un agente antiangiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina; o modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento.

El anticuerpo o composición variante se formulará, dosificará y administrará en una manera consistente con la buena práctica médica. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que está siendo tratado, el mamífero particular que está siendo tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa del

trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el calendario de administración y otros factores conocidos por los especialistas médicos. La "cantidad terapéuticamente efectiva" del anticuerpo o variante que se va a administrar será determinada por dichas consideraciones, y puede ser la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad, afección o trastorno relacionado con el glucoesfingolípidio de tipo I extendido.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), la cual es suficiente para reducir la gravedad y/o duración de una enfermedad asociada o relacionada con el glucoesfingolípidio de tipo I extendido, mejorar uno o más síntomas de la misma, prevenir el avance de una enfermedad asociada o relacionada con el glucoesfingolípidio de tipo I extendido, o causar la regresión de una enfermedad asociada o relacionada con el glucoesfingolípidio de tipo I extendido, o que es suficiente para dar como resultado la prevención del desarrollo, recidiva, inicio o progresión de una enfermedad asociada o relacionada con el glucoesfingolípidio de tipo I extendido o uno o más síntomas de la misma, o aumentar o mejorar los efectos profilácticos y/o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, otro agente terapéutico) útil para tratar una enfermedad relacionada o asociada con el glucoesfingolípidio de tipo I extendido. Por ejemplo, un tratamiento de interés puede reducir un síntoma, con base en el punto de partida o un nivel normal, en al menos aproximadamente 5%, de preferencia al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100%. En otra forma de realización, una cantidad efectiva de un agente terapéutico o profiláctico reduce un síntoma de una enfermedad asociada o relacionada con el glucoesfingolípidio de tipo I extendido, tal como cáncer, en al menos aproximadamente 5%, preferentemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100%. Usado también en la presente memoria como un equivalente, es la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva".

La cantidad de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo que será efectiva en el uso o tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse por técnicas clínicas estándares. Cuando sea posible, una curva de respuesta a la dosis y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden derivarse primero *in vitro*. Si está disponible un sistema de modelo animal adecuado, de nuevo una curva de respuesta a la dosis puede obtenerse y usarse para extrapolar una dosis humana adecuada, poniendo en práctica métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, en base al conocimiento común de la técnica, una composición farmacéutica efectiva para promover una disminución de un efecto inflamatorio, por ejemplo, puede proporcionar una concentración de agente terapéutico local de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 ng/ml y, de preferencia, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 ng/ml.

En una forma de realización preferida, una disolución acuosa de polipéptido terapéutico, anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse por inyección subcutánea. Cada dosis puede variar de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, o más preferiblemente, de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 30 mg por kilogramo de peso corporal. La dosificación puede averiguarse empíricamente para la enfermedad particular, población de pacientes, modo de administración, etc., poniendo en práctica métodos farmacéuticos conocidos en la técnica.

El calendario de dosificación para la administración subcutánea puede variar de una vez por semana a diariamente hasta múltiples veces al día, dependiendo de muchos factores clínicos, incluyendo el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del sujeto al agente terapéutico.

En una forma de realización, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína u otro anestésico con la terminación "caína" que alivie el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo como un polvo liofilizado seco o un concentrado en un recipiente cerrado herméticamente, tal como una ampolla o bolsita que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contenga agua o disolución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se va a administrar por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o disolución salina, por ejemplo en un kit, de modo que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

La invención proporciona también que una formulación líquida de la presente invención sea envasada en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad del producto interés. Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden estar en un recipiente cerrado herméticamente que indica la cantidad y concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La formulación líquida de la presente invención puede suministrarse en un recipiente cerrado herméticamente con al menos aproximadamente 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml de anticuerpo anti-glucoesfingolípidio de tipo I extendido, en una cantidad de aproximadamente 1

ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml, por ejemplo.

Se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es efectiva para diagnosticar, prevenir o tratar una afección o enfermedad relacionada con el glucoesfingolípido de tipo I extendido, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tenga un tapón horadable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta sobre o asociada con el recipiente indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de envase con instrucciones para su uso.

En otro aspecto de la invención, ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o derivados funcionales de los mismos, se administran para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad aberrantes del glucoesfingolípido de tipo I extendido, por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico de interés expresado o expresable. Alternativamente, unas células manipuladas para llevar secuencias de genes de interés se administran a un hospedante. En una forma de realización de la invención, los ácidos nucleicos producen la proteína codificada en y por células hospedantes diana que median un efecto terapéutico. Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles puede usarse de conformidad con la presente invención.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488 (1993); Wu et al., *Biotherapy* 3:87 (1991); Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32:573 (1993); Mulligan, *Science* 260:926 (1993); Morgan et al., *Ann Rev Biochem* 62:191 (1993); y May, *TIBTECH* 11:155 (1993).

En un aspecto, el compuesto comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo, o fragmentos de unión funcionales del mismo, siendo dichas secuencias de ácidos nucleicos parte de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas ligeras o pesadas del mismo en un hospedante adecuado. En particular, dichas secuencias de ácidos nucleicos tienen promotores enlazados operablemente al anticuerpo o región codificante de unión al antígeno, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejidos, así como otras secuencias reguladoras.

En otra forma de realización particular, se usan moléculas de ácidos nucleicos en las cuales las secuencias que codifican el anticuerpo y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de esta manera la integración y la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8932 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435 (1989)). En formas de realización específicas, la molécula de anticuerpo expresada es un anticuerpo monocatenario; alternativamente, las secuencias de ácidos nucleicos incluyen secuencias que codifican tanto las cadenas pesada como ligera, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo. Métodos alternativos para la integración incluyen el uso de factores de transcripción particulares que reconocen secuencias de ácidos nucleicos específicas, dedos de cinc, etc.

El suministro de los ácidos nucleicos a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente es expuesto directamente al ácido nucleico o vectores que poseen el ácido nucleico, o indirecto, en cuyo caso las células son transformadas primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, y trasplantadas entonces en el paciente.

En una forma de realización, las secuencias de ácidos nucleicos se administran directamente *in vivo* y son expresadas para producir el producto codificado. Esto puede lograrse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo construyendo las secuencias codificantes del anticuerpo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrando el mismo de modo que los vectores lleguen a ser intracelulares, por ejemplo por infección usando vectores retrovirales defectuosos o atenuados u otros vectores virales (véase la patente US nº 4.980.286), por inyección directa de ADN desnudo, por el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), usando vectores no virales, tales como composiciones sintéticas que comprendan un compuesto anfipático que se una al ácido nucleico hidrófilo y tenga la capacidad de fusionarse con células, generalmente conteniendo de esta manera una parte hidrófoba para combinación con membranas, revistiendo con lípidos o receptores de superficie de la célula o agentes transfectantes, encapsulamiento en liposomas, micropartículas o microcápsulas, administrando el vector en enlace con un péptido que es conocido que entra al núcleo, administrando el vector en enlace con un ligando sujeto a endocitosis mediada por el receptor (véase, por ejemplo, Wu et al., *J Biol Chem* 262: 4429 (1987)) (que puede usarse para dirigir tipos de células que expresan específicamente los receptores), etc. En otra forma de realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en los cuales el ligando comprende un péptido viral fusogénico que rompe los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En todavía otra forma de realización, el ácido nucleico puede ser dirigido *in vivo* para captación y expresión específica de

células, seleccionando como diana un receptor específico (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/06180; WO 92/22635; W092/20316; W093/14188; y WO 93/20221).

5 Respecto a los vectores, por ejemplo, puede usarse un vector lentivírico como es conocido en la técnica. Los vectores lentivíricos contienen componentes para el empaquetamiento del genoma viral e integración en el ADN de la célula hospedante. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo que se usará en terapia génica son clonadas en uno o más vectores, que facilitan el suministro del gen a un paciente. Por ejemplo, un vector lentivírico se puede usar para suministrar un transgén a células madre hematopoyéticas. Las referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en terapia génica son: Clowes et al., J Clin Invest 93:644 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467 (1994); Salmons et al., Human Gene Therapy 4:129 (1993); y Grossman et al., Curr Opin Gen and Dev 3:110 (1993).

15 También pueden usarse adenovirus en la presente invención. Las dianas para sistemas de suministro basados en adenovirus incluyen hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo, por ejemplo. Los adenovirus infectan a células que no están en división, una ventaja sobre los vectores retroviríricos tempranos. Kozarsky et al., Curr Opin Gen Dev 3: 499 (1993) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., Human Gene Therapy 5: 3 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld et al., Science 252:431 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143 (1992); Mastrangeli et al., J Clin Invest 91:225 (1993); documento W094/12649; y Wang et al., Gene Therapy 2:775 (1995).

20 También pueden usarse virus adenoasociados (AAV) en terapia génica (Walsh et al., Proc Soc Exp Biol Med 204: 289 (1993); y patentes US nº 5.436.146; nº 6.632.670; y nº 6.642.051).

25 Otro enfoque para terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo de tejidos por métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección viral. Usualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se ponen entonces bajo selección para aislar aquellas células que han absorbido y están expresando el gen transferido. Dichas células se suministran entonces a un paciente.

30 De esta manera, el ácido nucleico puede introducirse en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contenga las secuencias de ácidos nucleicos, fusión de células, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Numerosas técnicas se conocen en la técnica para la introducción de genes extraños en células (véanse, por ejemplo, Loeffler et al., Meth Enzymol 217:599 (1993); Cohen et al., Meth Enzymol 217:618 (1993); y Cline, Pharm Ther 29:69 (1985)), y pueden usarse de acuerdo con la presente invención, siempre que las funciones fisiológicas y del desarrollo necesarias de las células receptoras, no sean interrumpidas. La técnica debería de proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico sea expresado por la célula, sea heredable y sea expresado por la progenie de la célula.

45 Las células recombinantes resultantes pueden suministrarse a un paciente por diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre hematopoyéticas o células progenitoras) se administran preferentemente intravenosamente, por ejemplo, como es sabido en la técnica del trasplante de médula ósea. La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la materia.

50 Las células en las cuales un ácido nucleico puede ser introducido para fines de terapia génica comprenden cualquier tipo de célula disponible deseado, e incluyen, pero sin limitarse a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos y granulocitos, diversas células madre o progenitoras, en particular células progenitoras o células madre hematopoyéticas, por ejemplo como se obtienen de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

55 En una forma de realización, la célula usada para terapia génica es autóloga al paciente. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente invención son introducidas en las células, de modo que el transgén sea expresado por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran entonces *in vivo* para efecto terapéutico. En una forma de realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* puede usarse potencialmente de conformidad con la forma de realización de la presente invención (véanse por ejemplo, el documento WO 94/08598; y Stemple et al., Cell 71:973 (1992); Rheinwald Meth Cell Bio 21A:229 (1980); y Pittelkow et al., Mayo Clinic Proc 61:771 (1986)). Debido a que el glucoesfingolípido de tipo I extendido es expresado, por ejemplo, en células B, las células sanguíneas y células de médula ósea son células hospedantes adecuadas. Sin embargo, el alcance de la presente invención respecto al uso de hospedantes de células madre no contempla la obtención y el uso de un transgén para obtener un organismo transgénico administrando el transgén de interés a embriones y/o células madre embrionarias.

La invención proporciona de esta manera métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de enfermedades asociadas y relacionadas con el glucoesfingolípido de tipo I extendido, o uno o más síntomas de las mismas, administrando a un sujeto una cantidad efectiva, por ejemplo, de una formulación líquida, un anticuerpo o variante del mismo de la invención. El sujeto es preferentemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono tal como un macaco, y un ser humano). En una forma de realización preferida, el sujeto es un ser humano.

El glucoesfingolípido de tipo I extendido es expresado también en ciertas células cancerosas, tales como del páncreas, colon y vejiga, así como en leucemias de células T (Qinping et al., *Oncogene* 24: 573-584, 2005), y la estimulación del glucoesfingolípido de tipo I extendido se correlaciona con la proliferación de células de carcinoma; Meijer et al., *Canc Res* 66: 9576-9582, 2006.

De esta manera, el anticuerpo o derivado del mismo de interés puede usarse para controlar la proliferación de células cancerosas que expresan el glucoesfingolípido de tipo I extendido, cánceres los cuales se identifican determinando la presencia de la expresión del glucoesfingolípido de tipo I extendido mediante un ensayo de diagnóstico enseñado en la presente. El anticuerpo de interés puede reducir la infiltración de células malignas, así como reducir la resistencia a la apoptosis y reducir al mínimo la proliferación. A dichos pacientes se les administra entonces una cantidad de un anticuerpo, o derivado del mismo, de interés como se proporciona en la presente memoria, inhibidora de la proliferación de células cancerosas. Como se enseña en la presente memoria, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede administrarse a un paciente de muchas maneras, incluyendo administrar un polipéptido, un polinucleótido, etc. Esencialmente cualquier cáncer que exprese un epítipo de tipo I de interés puede detectarse y/o tratarse con un anticuerpo de interés. Por ejemplo, la célula maligna puede ser una célula epitelial. La célula epitelial puede encontrarse en cualquier célula maligna de cualquier origen órgano o tisular, tal como colon, recto, esófago, pulmón, próstata, mama, páncreas, la cavidad oral, vagina, el aparato digestivo en general, el aparato urinario, etc. Sin embargo, no es necesario limitar el cáncer a una célula epitelial, en tanto la célula maligna exprese un epítipo de tipo I de interés.

La invención se ejemplificará a continuación para el beneficio del experto en la materia mediante los siguientes ejemplos no limitantes que describen algunas de las formas de realización por y en las cuales la presente invención puede ponerse en práctica.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 generación de inmunógeno

Se cultivan células Colo205 (ATCC) (Semple et al., *Cáncer Res* 38: 1345-1355, 1978) en medio RPMI 1640 que contiene suero fetal de ternera al 10%. Las células cosechadas se lavan dos veces con PBS, y se almacenan a -20°C hasta que sean necesarias. Los sedimentos celulares se extraen con isopropanol-hexano-agua (IHW) (55:25:20) seguidos de reparto de Folch, cromatografía de DEAE Sephadex y HPLC sobre una columna 6RS-8010 latrobead. La elución por gradiente de la fracción neutra de la fase superior se realiza en IHW de 55:40:5 a 55:25:20 durante 200 minutos. Las fracciones se recogen y se reúnen de acuerdo con la migración en HPTLC en cloroformo-metanol-agua (50:40:10). Los glucoesfingolípidos de cadena de tipo I extendida se purifican adicionalmente por TLC preparativa sobre placas para HPTLC de Merck (gel de sílice 60, Merck, Darmstadt, Alemania); véase la patente U.S. n° 6.083.929.

Una banda positiva (por inmunotinción con el mAb IMH2) que migró justo debajo del antígeno Le<sup>a</sup> dimérico se purifica como se enseña en la presente.

Las células de adenocarcinoma colorrectal Colo205 (ATCC CCL-222) y DLD-1 (ATCC CCL-221) se cultivan en medio RPMI 1640 (Invitrogen Co., n° de catálogo 31800) suplementado con piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen Co., n° de catálogo 11360). Otras células de adenocarcinoma colorrectal, SW1116 (ATCC CCL-233) y HT-29 (ATCC HTB-38) y células T84 derivadas de pulmón (ATCC, CCL-248) se mantienen por separado en medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen Co., n° de catálogo 41300), medio 5a de McCoy (Invitrogen Co., n° de catálogo 12330) y medio DMEM/F12 (Invitrogen Co., n° de catálogo 12400). Las células de carcinoma gástrico KATO III (ATCC HTB-103) se cultivan en medio IMDM (Invitrogen Co., n° de catálogo 12200). Todos los medios usados en los estudios se suplementan con suero fetal de ternera al 10%.

### Ejemplo 2 generación de mab anti glucoesfingolípido tipo I extendido

Se generan ratones KM (Kirin Brewery Co., Ltd.) por cruzamiento de razas de ratones trans cromosómicos dobles y ratones transgénicos. Los ratones KM poseen fragmentos de cromosomas humanos que contienen a todos los loci de la cadena pesada de inmunoglobulina humana y un transgén de YAC para la mitad de los loci de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana. Los ratones KM son diseñados para que no expresen ni la cadena pesada de inmunoglobulina endógena ni la cadena ligera kappa. Todos los animales se mantienen y se manipulan de acuerdo con las reglas y regulaciones aceptadas en la técnica.

Se inyectan intraperitonealmente células Colo205 en los ratones KM cada 3 semanas ( $5 \times 10^6$  células/inyección) para un total de 4 inyecciones, seguidas de inyección de glucoesfingolípidos de cadena tipo I extendida que se aíslan de células Colo205 y se adsorben sobre lipopolisacárido (Sigma, L-7011) (Young et al., J. Exp. Med. 150: 1008-1019, 1979) cada semana durante 8 inyecciones. Los títulos del antiglucoesfingolípidos neutro Colo205 de los ratones inmunizados se monitorizan por ELISA usando antikappa humana-HRP (Southern Biotechnology Associates, nº de catálogo 9220-05) como el anticuerpo secundario, hasta que el título alcanzó 1:6000. Tres días después de la inyección final, los esplenocitos del ratón revacunado se fusionaron con células de mieloma de ratón P3/NS1/1-Ag4-1 (NS-1) (ATCC TIB-18), poniendo en práctica métodos conocidos en la técnica. Los hibridomas se seleccionan por ELISA usando placas de ELISA de 96 pocillos (Costar, nº de catálogo 2592) recubiertas con glucolípido neutro de Colo205. Anticuerpos de ratón anti-IgG humana conjugados con HRP se usan como el anticuerpo secundario (Southern Biotechnology Associates, nº de catálogo 9040-05), y se usa tetrametilbencideno (TMB) (Kem-Zn-Tec Diagnostics, nº de catálogo 4390) como el sustrato. Los sobrenadantes del hibridoma que muestran alta reactividad con los glucolípidos neutros de Colo205 se confirman adicionalmente por inmunotinción en HPTLC y por citometría de flujo. Los clones que tiñen fuertemente los glucolípidos de cadena de tipo I extendida y que muestran alta unión sobre la superficie de las células Colo205 son subclonados repetidamente por dilución limitante hasta que se establecen clones estables. Un clon estable es GNX-8.

### Ejemplo 3 anticuerpo gnX-8

Se purifica el anticuerpo monoclonal de los sobrenadantes de cultivo usando proteína A Sepharose (GE Healthcare 17-129-79-02) con elución por gradiente de pH, de acuerdo con los procedimientos sugeridos por el fabricante. Cada fracción se recoge, y se examina la presencia del anticuerpo por ELISA. Las fracciones con actividad de unión al glucolípido neutro de Colo205 se reúnen y se dializan contra PBS (pH 7,4). Los anticuerpos purificados se distribuyen en alícuotas y se almacenan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La concentración de anticuerpo monoclonal se determina con el kit de ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad, nº de catálogo 500-0006) usando IgG como el patrón, de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante.

El isotipo de GNX-8 se determina usando un ELISA. GNX-8 es una IgG1 humana, y la cadena ligera es kappa.

El GNX-8 purificado se aplica a geles de SDS-poliacrilamida al 10% después de que son hervidos en tampón de carga de gel de SDS 2X con (condición reductora) o sin  $\beta$ -mercaptoetanol (condición no reductora). La electroforesis se lleva a cabo usando el sistema de electroforesis Minutesi-PROTEAN3 (BIO-RAD), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

El GNX-8 separado en geles de SDS-PAGE reductores es transferido sobre membranas de nitrocelulosa (NC) (Amersham) y se bloquea con leche desnatada al 3% en PBS. La membrana se incuba con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo de cabra anti-IgG( $\gamma$ ) humana marcado con HRP (Zymed, 62-8420) a dilución 1:5000 y el anticuerpo de conejo anti-IgG de cadena kappa humana marcado con HRP (DAKO, P0129) a dilución 1:2000 se usan por separado para detectar la cadena pesada y la cadena ligera de GNX-8. Se usa Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, nº de catálogo NEL105) para desarrollar la señal sobre BioMax Light Film (KODAK, nº de catálogo 1788207).

En condiciones reductoras, el peso molecular de la cadena ligera y de la cadena pesada de GNX-8 es como se espera para una IgG. GNX-8 es un anticuerpo monoclonal humano por transferencia Western con anti-IgG( $\gamma$ ) humana de cabra-HRP y anticadena kappa humana de conejo-HRP como anticuerpos secundarios, por separado. El GNX-8 es un anticuerpo humano por isotipado con ELISA.

El análisis del pI de GNX-8 se determina por el PhastSystem (Pharmacia). Brevemente, una muestra del anticuerpo y el patrón de pI se aplican sobre un IEF PhastGel 3-9 usando un PhastGel Sample applicator 8/1 comb, y se separan de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después, el gel se tiñe con plata en la PhastSystem Development Unit (Pharmacia), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

El análisis del pI revela múltiples bandas que oscilan desde pH 8,15 hasta 8,65, indicando la posibilidad de modificaciones post-traduccionales del anticuerpo. El elevado pI indica que GNX-8 será soluble a pH fisiológico.

Para detectar la actividad de unión a células, se lavan  $2 \times 10^5$  células con PBS y se incuban con diversas concentraciones de anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado con PBS, se añaden anticuerpos de cabra anti-IgG (Fc) humana marcados con FITC, a dilución 1:3000 (ICN, nº de catálogo 55198), a cada muestra de células durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Para estudios de CDC, las células después del tratamiento con el anticuerpo se lavan tres veces con PBS y se incuban con  $1 \mu\text{l}$  de disolución de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, P4846) durante 30 minutos. Después de un lavado final con PBS, las células se analizan en un citómetro de flujo (BD, FACSort). Los resultados se procesan con CELLQuest 3.3 (BD).

**Ejemplo 4 ensayo de citotoxicidad**

Las líneas de células de cáncer de colon humano SW1116, Colo205 y DLD-1 se siembran en placas de 48 pocillos (Corning Costar) a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pocillo. Después de cultivarlas durante toda la noche, las células se incuban en 500  $\mu$ l de medio con suero humano no inactivado al 25% a diversas concentraciones de anticuerpo durante 2 horas. Después de un lavado con PBS, las células vivas restantes se cuantifican por tinción con disolución de yoduro de propidio (PI) (Sigma-Aldrich, P4846) y se analizan por citometría de flujo. Como control negativo se usan IgG humanas normales purificadas procedentes de suero humano normal.

En un ensayo alternativo, células diana se marcan por incubación con aproximadamente 100  $\mu$ l de  $^{51}\text{Cr}$  durante aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 37°C. Después de lavar (3x) e incubar (aproximadamente 1 hora a 37°C), las células (aproximadamente  $1 \times 10^6$  ml) se suspenden en medio RPMI-1640 suplementado con tampón de HEPES aproximadamente 25 mM y seroalbúmina bovina a aproximadamente 3%. Aproximadamente 20  $\mu$ l de células marcadas, aproximadamente 100  $\mu$ l de mAb y suero humano inactivado con calor al 25% se mezclan en las pocillos de placas de microtitulación de fondo en U (Corning, N.Y.). Como control negativo puede usarse Ig de ratón no específica (Sigma, St. Louis, MO). Después de aproximadamente 4 horas de incubación, las placas se centrifugan (500 x g, 2 minutos) con un soporte de placa colgante ensamblado en una centrifugadora, y se mide la radiactividad en aproximadamente 100  $\mu$ l de sobrenadante en cada pocillo con un contador gamma. Cada grupo experimental puede ensayarse por triplicado. El porcentaje de lisis específica puede calcularse de acuerdo con la fórmula  $([A-B] \times 100)/C$ , en la que A=cpm en células experimentales lisadas; B=cpm en células diana no lisadas; y C=cpm en células diana totales. Preferentemente, la liberación espontánea no debe exceder 15% de la radiactividad marcada liberable al máximo.

Se llevan a cabo ensayos de ADCC mediante el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Promega, ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96®), usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas como células efectoras preparadas a partir de donantes sanos usando Ficoll-Paque (GE, 71-7167-00). El ensayo mide cuantitativamente la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que es liberada en la lisis de células. La LDH liberada en los sobrenadantes de cultivo se mide con un ensayo enzimático acoplado durante 30 minutos, que da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio (INT) en un producto de formazano rojo. La cantidad de color formada es proporcional al número de células lisadas.

Las células Colo205 usadas como células diana se distribuyen en placas de 96 pocillos de fondo en U ( $2 \times 10^4$  células/pocillo), y se incuban con anticuerpos en presencia de las PBMC con diversas relaciones E/T durante 4 horas a 37°C. La actividad de LDH en el sobrenadante se midió mediante el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96®. El porcentaje de citólisis específica se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula: % de lisis específica =  $100 \times (E - S_E - S_T) / (M - S_T)$ , en la que E es la liberación experimental (actividad en el sobrenadante de células diana incubadas con anticuerpo y células efectoras),  $S_E$  es la liberación espontánea en presencia de células efectoras (actividad en el sobrenadante de células efectoras con medio solo),  $S_T$  es la liberación espontánea de células diana (actividad en el sobrenadante de células diana incubadas con medios solo), y M es la liberación máxima de células diana (actividad liberada de células diana lisadas con Tritón X-100 al 9%).

La actividad antitumoral *in vitro* de GNX-8 se evalúa mediante ensayo de CDC. El tratamiento de las células de cáncer colorrectal humano, SW1116, Colo205 y DLD-1, con GNX-8 en presencia de suero humano al 25% da como resultado lisis celular sustancial de una manera dependiente de la dosis. Los resultados indican que GNX-8 destruye a las células diana a través de citólisis dependiente del complemento.

El efecto de CDC sobre células SW1116 y Colo205 en algunos experimentos es más fuerte que aquel sobre células DLD-1. La viabilidad de las células es inversamente proporcional al nivel de expresión del antígeno de GNX-8. El efecto de CDC de GNX-8 y los niveles de expresión del antígeno de GNX-8 sobre las tres líneas de células de cáncer colorrectal demuestran que las células cancerosas con mayor expresión del antígeno de GNX-8 son más susceptibles a la citotoxicidad, mientras que aquellas con menor expresión del antígeno de GNX-8 tienen mayor viabilidad. Los resultados llevan a la conclusión de que la actividad antitumoral de GNX-8 puede depender del nivel de expresión del antígeno de GNX-8. Los pacientes con expresión elevada del antígeno de GNX-8 sobre células tumorales podrían tratarse con GNX-8 solo, mientras que los tumores que expresan menores niveles del antígeno de GNX-8 pueden beneficiarse de una terapia de combinación con uno o más de otros fármacos para el cáncer además del anticuerpo GNX-8.

La actividad de ADCC de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas se evalúa frente a cáncer colorrectal humano Colo205 en presencia de GNX-8. La actividad de ADCC con IMH2 se usa como el control positivo, y la IgG humana como el control negativo.

El GNX-8 induce una fuerte actividad de ADCC contra células Colo205. El efecto citotóxico se correlaciona positivamente tanto con la relación E/T como con la concentración de GNX-8. Se observa un cien por cien de lisis de células a una E/T de aproximadamente 20/1. Se observa un efecto de ADCC máximo, y una tendencia observada igualmente para aproximadamente 50% de lisis, a aproximadamente 5  $\mu$ g/ml de GNX-8 y a aproximadamente 50



µg/ml para IMH2, respectivamente. La IgG humana de control no muestra efecto citotóxico, independientemente de la relación E/T o la concentración de IgG. La dosis de GNX-8 para alcanzar 50% de lisis es menor que un décimo de la necesaria para IMH2.

#### 5 **Ejemplo 5 análisis de afinidad por biacore**

Los glucoesfingolípidos de tipo I se fijan a un chip. Entonces, los mAb se exponen al chip para medidas cinéticas y el análisis de las secuencias de los epítomos en torno a la reacción de unión entre el anticuerpo y el antígeno, siguiendo las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

10

#### **Ejemplo 6: ensayo *in vivo***

La actividad antitumoral de GNX-8 se evalúa en un modelo de xenoinjerto de Colo205. Células Colo205 se lavan dos veces con PBS y se reconstituyen a una densidad celular de  $5 \times 10^6/100 \mu\text{l}$  en PBS. Ratones atímicos hembras de 6 a 8 semanas se inoculan s.c. con  $100 \mu\text{l}$  de la suspensión de células Colo205 en la región del flanco. El tamaño de los tumores se mide tres veces por semana con un calibre de vernier, y los pesos de los tumores (mg) se estiman como  $(\text{anchura}^2 \times \text{longitud})/2$ . Se inyecta i.p. GNX-8 o IgG humana normal en ratones atímicos que poseen tumores, de acuerdo con las dosis y los calendarios designados.

15

20

Para evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de GNX-8, se inyectan células cancerosas ( $5 \times 10^6$  células/ratón) en ratones atímicos, y se tratan con GNX-8 (grupo de tratamiento, 8 ratones/grupo) o IgG humana normal (grupo de control, 7 ratones/grupo) 24 horas después de la inoculación del tumor. Se inyectan en ambos grupos cinco dosis ( $300 \mu\text{g/ratón}$ ) a intervalos de 24 horas y después cuatro dosis ( $600 \mu\text{g/ratón}$ ) a intervalos de 48 horas.

25

El crecimiento tumoral es inhibido significativamente en los ratones tratados con GNX-8. El grupo de tratamiento alcanza un peso tumoral de la mediana de T/C (tratamiento/control) de aproximadamente 23% en el día 11, y continúa a ese nivel aproximado hasta el final del estudio. Una medida de  $T/C \leq 42\%$  se considera como significativa en la demostración de la actividad antitumoral.

30

La mitad (4/8) de los ratones en el grupo de tratamiento con GNX-8 logra una supervivencia libre de tumores a largo plazo durante 50 días. Por otra parte, el tamaño del tumor de los animales del grupo de control aumenta continuamente durante el estudio.

35

Se lleva a cabo un estudio similar en un modelo de ratones atímicos con xenoinjerto de Colo205. La primera dosis de GNX-8 se da a un tamaño tumoral de 80 a 100 mg. Se inyecta GNX-8 (grupo de tratamiento) e IgG humana normal (grupo control) una vez ( $300 \mu\text{g/ratón}$ ) diariamente por cinco días, y con dos dosis similares en los días 17 y 21.

40

También se aprecia una inhibición tumoral significativa en el grupo de tratamiento, aunque los tratamientos se descontinúan después de solo 5 dosis. El peso tumoral de la mediana de T/C (tratamiento/control) es menor de 42% después del día 10 y hasta el final del estudio.

45

Para determinar si la función efectora del hospedante contribuyó a la eficacia de GNX-8, ratones SCID que poseen xenoinjertos de Colo205 se tratan con GNX-8 o IgG humana normal a  $600 \mu\text{g/ratón}$  dos veces por semana durante tres semanas. El tamaño del tumor se mide dos veces cada semana hasta que el tamaño del tumor alcanza 10% del peso corporal, el cual se considera el punto final del estudio.

La supervivencia se prolonga en el grupo de tratamiento.

50

Para explorar la aparición del epítipo de GNX-8 en cánceres colorrectales humanos, se analizan varias líneas de células de cáncer colorrectal humano.

Por ejemplo, la inhibición *in vivo* de DLD-1 por GNX-8 es significativa.

#### 55 **Ejemplo 7: antígeno de gnx-8**

Para el análisis de la glucoproteína celular, se raspan unas células cultivadas de los matraces T-75, y se lavan dos veces con PBS, seguido de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1% y PMSF 1 mM). Los lisados se hacen pasar varias veces a través de una aguja de calibre 26 para dispersar cualquier agregado grande. La concentración de proteína se determina mediante el Protein Assay Kit (Bio-Rad). Los lisados que contienen la misma cantidad de proteínas se separan sobre un gel y se analizan por transferencia Western con GNX-8 como el anticuerpo primario y anticuerpo de ratón anti-IgG (Fc) humana marcado con HRP (Southern Biotechnology Associates, #9040-05) como el anticuerpo secundario. Se usa Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, nº de catálogo NEL105) para desarrollar la señal sobre BioMax Light Film (KODAK, nº de catálogo 1788207).

65

Se aplican unos glucolípidos neutros (2  $\mu$ l/muestra) sobre una placa de HPTLC (Merck, 1.05642, gel de sílice 60 F<sub>254</sub>), y se desarrollan con una fase móvil que contiene cloroformo:metanol:agua a una relación de 50:40:10 (V:V:V). Para la tinción de los glucolípidos con glucano, se rocía orcinol al 0,2% (Sigma, 0-1875) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% sobre una placa de HPTLC y se incuba durante 10 minutos en un horno a 110°C. Para inmunotinción, la placa de HPTLC se fija primero con poli(metacrilato de isobutilo) al 0,5% (Aldrich, 181544) en cloroformo:hexano, 1:9 (V:V) durante 45 segundos, seguido del bloqueo durante 10 minutos en PBS/BSA al 3%. Las placas se lavan entonces con PBS y se incuban con el anticuerpo primario a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido del anticuerpo secundario biotinilado a temperatura ambiente durante 1 hora. Se usa un kit de complejo de avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para amplificar las señales procedentes del anticuerpo secundario. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido del desarrollo del color con un kit de HPR-1000 para inmunotinción (Konica Minolta, 130990), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

A una muestra liofilizada se le añaden 20  $\mu$ l de fluoruro de hidrógeno (HF) (Merck) al 48%, y entonces la mezcla se incuba a 4°C durante 48 horas. Al final de la reacción, el HF se elimina con N<sub>2</sub> gaseoso. Los glucolípidos defucosilados se usan para el estudio de especificidad de GNX-8.

Los glucolípidos neutros de Colo205 se tratan con HF y se analizan por MS MALDI-TOF para confirmar la eliminación de la fucosa. Se lleva a cabo la inmunotinción en TLC para analizar la especificidad de GNX-8 dirigido contra los glucolípidos neutros de Colo205, antes y después del tratamiento con HF.

El GNX-8 reconoce los glucolípidos no escindidos, pero no las formas defucosiladas, sugiriendo que el epítipo de GNX-8 es un resto de hidrato de carbono y la fucosa es un componente esencial de la estructura.

La especificidad de GNX-8 se caracteriza además por inmunotinción en HPTLC sobre glucolípidos neutros y monosialilados aislados de células Colo205. Se recogen cien gramos de células Colo205, y se extraen las fracciones de glucolípido. Los glucolípidos de Colo205 separados por TLC se tiñen para hidrato de carbono con orcinol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las posiciones de Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>a</sup>-Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup>-Le<sup>a</sup> se identifican de acuerdo con Stroud et al. (1992), más arriba. Sialil Le<sup>a</sup> (SLe<sup>a</sup>) se indica mediante tinción con el mAb NKH3 (patente U.S. nº 5.240.833), y se identificó posteriormente con MS MALDI. La inmunotinción en HPTLC de las mismas fracciones de glucolípido se lleva a cabo con anticuerpos CF4C4 (patente U.S. nº 5.011.920) (anti-Le<sup>a</sup>), T218 (Abeam, Cambridge, MA) (anti-Le<sup>b</sup>), IMH2 (Stroud et al., 1992, más arriba) (anti-Le<sup>b</sup>-Le<sup>a</sup>) y GNX-8.

Los resultados indican que GNX-8 reacciona fuertemente con los glucolípidos de cadena de tipo I extendida. GNX-8 no se unió a las cadenas de tipo I extendidas de Le<sup>a</sup>. Los glucolípidos monosialilados de células Colo205 no son reconocidos por GNX-8. GNX-8 muestra reactividad cruzada muy ligera con Le<sup>b</sup> a mayor concentración (0,6  $\mu$ g/ml). A diferencia de IMH2, GNX-8 no se unió a Le<sup>x</sup> o a Le<sup>y</sup>. GNX-8 se une a una cadena extendida que contiene Le<sup>b</sup>. GNX-8 se une a Le<sup>b</sup>-Le<sup>a</sup>.

Además de la inmunotinción en TLC, el epítipo de GNX-8 se caracteriza por ELISA competitivo usando los glucanos sintéticos Le<sup>b</sup>, Le<sup>a</sup>-Le<sup>x</sup>, Le<sup>b</sup>-Le<sup>x</sup> y Le<sup>x</sup>-Le<sup>x</sup> como inhibidores, y la mezcla de glucolípidos Le<sup>b</sup>-Le<sup>a</sup>-Le<sup>a</sup>-Le<sup>a</sup> como un control positivo.

Los resultados indican que GNX-8 reacciona de forma cruzada ligeramente con Le<sup>b</sup>-Le<sup>x</sup> a alta concentración de inhibidor, pero no tiene reactividad con otros glucanos sintéticos ensayados, incluyendo los glucanos Le<sup>b</sup> sintéticos. La actividad de unión de GNX-8 a Le<sup>b</sup> extendido es 1000 veces mayor que la de Le<sup>b</sup> simple.

Basándose en los resultados, el epítipo de GNX-8 es probablemente una estructura de Le<sup>b</sup> en una cadena de tipo I extendida con fucosilación, pero no es un Le<sup>b</sup> simple.

### 50 Ejemplo 8: distribución celular y tisular

Se obtienen muestras de tejidos cancerosos y normales humanos embebidos en parafina y fijados con formalina, por ejemplo de US Biomax.

Las matrices de tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina de tejidos humanos malignos y normales se bloquean con leche desnatada al 0,1% en PBS durante 30 minutos. Después de otros 10 minutos de incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, las matrices de tejidos se lavan tres veces con PBS antes de que las muestras se incuben con GNX-8 biotinilado diluido con PBS/BSA al 0,1% durante 1 hora. Entonces, las muestras de tejido se hacen reaccionar con complejo de biotina-estreptavidina-peroxidasa (kit de ABC, Vector, #PK-6100) durante 30 minutos, para la amplificación de la señal. El kit del sustrato DAB PLUS (Zymed, #00-2020) se usa para visualizar la tinción inmunorreactiva de acuerdo con el protocolo del fabricante. La contratinción se lleva a cabo usando hematoxilina. Los resultados se determinan por visualización bajo un microscopio óptico.

La expresión del antígeno de GNX-8 en células cancerosas humanas se evalúa por citometría de flujo. Muchas líneas de células de tumor gástrico y colorrectal humanos, tales como Colo205, HT-29, DLD-1, SW1116, T84 y

KATO III, se examinan por separado para determinar la expresión del antígeno de GNX-8 por citometría de flujo.

5 Los análisis de citometría de flujo demuestran que GNX-8 exhibe actividad de unión a todas las líneas de células cancerosas ensayadas. Sin embargo, la unión es significativamente más fuerte a células SW1116, Colo205 y DLD-1 que a las otras líneas de células cancerosas humanas ensayadas.

10 Además, la expresión del antígeno de GNX-8 se ensaya en HL60 (una línea de células promielocíticas), MCF-7 (una línea de células de cáncer de mama) y PANC-1 (una línea de células de cáncer de páncreas), así como en una línea de células de cáncer de colon de ratón, CT26. GNX-8 no se une a estas cuatro líneas de células.

15 Dos líneas de células de cáncer colorrectal, Colo205 y SW1116, se analizan mediante transferencia Western. Las dos líneas de células demostraron fuerte unión con GNX-8 en los análisis de citometría de flujo.

Los resultados muestran la presencia del antígeno de GNX-8 en la glucoproteína de Colo205 y SW1116 a lo largo de un intervalo de pesos moleculares de 32 a > 175 kDa. Por consiguiente, los antígenos de GNX-8 no están solo en los glucolípidos sino también en las glucoproteínas.

20 Una variedad de muestras de diversos órganos, incluyendo tejidos cancerosos y tejidos normales, se tiñen por separado con GNX-8. Los patrones de tinción en las muestras de tejido se evalúan por intensidad y frecuencia de tinción de células positivas. La tinción se clasifica en una escala de 1+ (10-20%), 2+ (20-50%) o 3+ (> 50%), mientras que la frecuencia se clasifica en base al porcentaje de células positivas en cada sección.

25 Se aprecia una fuerte correlación entre la expresión del antígeno de GNX-8 en los carcinomas colorrectales primario y metastásico. Se lleva a cabo una tinción inmunohistoquímica de un panel de secciones tisulares de un paciente con cáncer colorrectal.

30 El antígeno de GNX-8 es expresado no solo en los tejidos de cáncer colorrectal sino también en tejidos adyacentes. Por ejemplo, un pólipo próximo a una región de cáncer es teñido por GNX-8. Sin embargo, no se observa tinción en los tejidos normales distales. Por lo tanto, puede concluirse que GNX-8 identifica a las células transformadas o las células que sufren transformación antes de que ocurran cambios reconocibles en la morfología de las células.

La expresión del antígeno de GNX-8 se estudia también en diversos grados de cáncer.

35 El antígeno de GNX-8 es expresado en cada etapa de cáncer.

El GNX-8 no se une a colon, recto, estómago, intestino delgado, hígado, esófago, pulmón, próstata o mama normales.

40 Cincuenta y ocho por ciento (44/76) de las muestras de cáncer de colon son teñidas con GNX-8; 47% de las muestras de cáncer de recto; 57% de las muestras de cáncer de colon metastásico; 52% de las muestras de cáncer de estómago; 29% de las muestras de cáncer de esófago; 22% de las muestras de cáncer de pulmón; 4% de las muestras de cáncer de próstata; 17% de las muestras de cáncer de mama; y 67% de las muestras de cáncer pancreático, son teñidas con GNX-8. GNX-8 no se une a las muestras de cáncer de intestino delgado, hígado y riñón.

45 Tabla 1 Especificidad de GNX-8 en tejidos normales humanos

Tejidos normales	
Tejidos humanos	Incidencia (Nº de positivos/Nº ensayados)
Colon	14/102
Esófago	3/4*
Mama	13/56 <sup>§</sup>
Páncreas	4/12 <sup>#</sup>
Riñón	11/63 <sup>#</sup>
Recto	1/106
Intestino delgado	0/2
Hígado	0/4
Pulmón	0/3
Próstata	0/6

\* teñido en la queratinización de epitelio escamoso estratificado

§ teñido en células epiteliales de conductos lactíferos/sistema de conductos

# teñido en células epiteliales del sistema de conductos.

Tabla 2 Especificidad de GNX-8 en tejidos cancerosos humanos

Tejidos cancerosos humanos	Incidencia (Nº de positivos/Nº ensayados)	Intensidad y localización de la tinción
Colón	44/76	3+(5), 2+(12), 1+(27)
Recto	50/107	3+(13), 2+(20), 1+(17)
Intestino delgado	0/10	
Hígado	0/12	
Riñón	0/3	
Colón (metastásico)	27/47	2+(9), 1+(18)
Esófago	4/14	2+(1), 1+(3)
Pulmón	10/45	3+(1), 2+(5), 1+(4)
Próstata	2/45	2+(2)
Mama	7/45	3+(1), 2+(4), 1+(2)
Páncreas	8/12	2+(3), 1+(5)

**Ejemplo 9 clonación y secuenciación de gnx-8**

5

Las células de hibridoma que producen GNX-8 se cultivan habitualmente en IMDM (Invitrogen) que contiene suero fetal bovino al 10% de bajo contenido de IgG (HyClone). Para preparar ARN para la síntesis de ADNc,  $1 \times 10^6$  de células de hibridoma se cosechan primero por centrifugación a baja velocidad (1000 rpm, 5 minutos). El ARN total se aísla entonces del sedimento celular usando reactivo TRIZOL (Invitrogen), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los ADNc de primera cadena se sintetizan a partir de la muestra de ARN purificada usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (BD Biosciences-Clontech). De forma breve,  $1 \mu\text{g}$  de ARN total se incuba con  $1 \mu\text{l}$  de 5'-CDS y  $1 \mu\text{l}$  de cebadores oligo SMART II A a  $70^\circ\text{C}$  durante 2 minutos. Después de añadir  $2 \mu\text{l}$  de 5x tampón de la primera cadena, a la mezcla de ARN/cebador se añaden  $1 \mu\text{l}$  de DTT 20 mM,  $1 \mu\text{l}$  de dNTP 10 mM y  $1 \mu\text{l}$  de transcriptasa inversa PowerScript RT. La muestra se incuba adicionalmente a  $42^\circ\text{C}$  durante 1,5 horas. La reacción de síntesis de ADNc de la primera cadena concluye añadiendo  $100 \mu\text{l}$  de tampón de Tricina e incubando a  $72^\circ\text{C}$  durante 7 minutos.

10

15

20

El ADNc que codifica el fragmento de la cadena pesada de GNX-8 se amplifica por PCR usando UPM (kit de amplificación de ADNc SMART RACE de BD), y un cebador del extremo 3' de la cadena pesada, CH1, SEC ID NO: 3. La reacción de PCR se lleva a cabo a  $94^\circ\text{C}$  durante 30 segundos, seguido de  $58^\circ\text{C}$  durante 30 segundos,  $72^\circ\text{C}$  durante 3 minutos, y este ciclo se repite 26 veces.

25

La región variable del ADNc de la cadena pesada se vuelve a amplificar a partir de  $1 \mu\text{l}$  del producto de la reacción anterior en presencia de NUP (kit de amplificación SMART RACE) y un cebador de la parte media de la cadena pesada CH1, SEC ID NO: 4. La reacción de PCR se lleva a cabo a  $94^\circ\text{C}$  durante 15 segundos,  $68^\circ\text{C}$  durante 30 segundos, y este ciclo se repite 25 veces. El producto amplificado se purifica usando un kit de purificación de PCR (GeneMark), y la secuencia nucleotídica se determina usando un cebador del extremo 5' de la cadena pesada CH1, SEC ID NO: 5.

30

Basándose en la información de secuencia, el ADNc de la cadena pesada de longitud completa se amplifica específicamente por PCR a partir de los ADNc de la primera cadena previamente preparados con los cebadores recién sintetizados, SEC ID NO: 6, y para el extremo del gen de la cadena pesada, SEC ID NO: 7, con el sistema de enzimas de PCR Advantage™ 2 (BD Biosciences). La reacción de PCR se ajusta a  $94^\circ\text{C}$  durante 40 segundos,  $60^\circ\text{C}$  durante 30 segundos y  $72^\circ\text{C}$  durante 100 segundos, y ese ciclo se repite 35 veces.

35

40

El ADNc de la cadena pesada de longitud completa amplificado es primero doblemente digerido con EcoRI y XbaI. Después de la purificación en gel, el ADNc de la cadena pesada recuperado se liga entonces en el vector pCIneo (Promega) en los mismos sitios, para obtener el vector de expresión pCI-GNX-8.H3. La secuencia de ADNc insertada se confirma usando un cebador que se hibrida hacia el extremo 5' del sitio de clonación múltiple, SEC ID NO: 8, y un cebador hacia el extremo 3' del sitio de clonación múltiple, SEC ID NO: 9. El ADNc de la cadena pesada de GNX-8 y la secuencia de aminoácidos deducida se muestran en la Tabla 3 como SEC ID NOS: 14 y 15, respectivamente.

45

Para identificar las secuencias de ADNc de la cadena ligera, el péptido de la cadena ligera de GNX-8 se somete a análisis de espectrometría de masas y búsqueda de base de datos. De acuerdo con la información de la identificación de la proteína, la cadena ligera de GNX-8 es homologa a la cadena  $\lambda$  de ratón. Se sintetiza un cebador que flanquea el extremo 5' de la región constante del gen lambda de ratón, SEC ID NO: 10. Un ADNc que incluye la región variable y una parte de la región constante del gen de la cadena ligera se amplifica por PCR de rampa decreciente de temperaturas, a partir de los ADNc de primera cadena descritos anteriormente. La reacción de PCR se lleva a cabo primero durante 5 ciclos de 30 segundos a  $94^\circ\text{C}$ , 90 segundos a  $72^\circ\text{C}$ , seguido de 5 ciclos de 30 segundos a  $94^\circ\text{C}$ , 30 segundos a  $66^\circ\text{C}$ , 90 segundos a  $72^\circ\text{C}$ , y entonces el ciclo de 30 segundos a  $94^\circ\text{C}$ , 30

50

segundos a 63°C y 90 segundos a 72°C, se repite 27 veces. Los fragmentos de PCR amplificados se introducen entonces en el vector  $\gamma$ T&A (Yeastern Biotech) para la identificación del clon positivo.

5 Cuatro clones con el tamaño esperado se seleccionan para la determinación de la secuencia con el cebador, SEC ID NO: 11.

Los resultados indican que los cuatro clones tienen ADNc idéntico, con una estructura homologa al extremo 5' de genes de la cadena ligera conocidos.

10 Para reconstituir el ADNc de la cadena ligera de longitud completa, se sintetiza una nueva serie de cebadores, SEC ID NO: 12 y SEC ID NO: 13, y el ADNc descrito anteriormente se usa para preparar solo la región variable del gen de la cadena ligera por PCR. La reacción de PCR incluye 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto.

15 El ADNc de la región variable de la cadena ligera amplificado con los sitios de las enzimas de restricción EcoRI y BsiWI incorporados es digerido con las enzimas respectivas. Después de la purificación en gel de agarosa, el fragmento de ADNc de la región variable amplificado se liga en los mismos sitios del vector pClick (un vector de expresión basado en pCIneo con la inserción de una región constante  $\kappa$  humana en los sitios XbaI y NotI) para proporcionar el vector de expresión de la cadena ligera pClick-GNX-8.m $\lambda$ . Se realiza la confirmación de la secuencia, y el nucleótido deducido, así como las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de GNX-8, se muestran como SEC ID NOS: 16 y 17, respectivamente.

25 Un vector individual que expresa los genes de la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo GNX-8 recombinante se construye con el gen de neomicina (pClick-GNX-8 neo) o el gen de DHFR (pClick-GNX-8 DHFR) como marcador de selección. El vector de la cadena ligera pClick-GNX-8.m $\lambda$  se linealiza con BglII, seguido de la desfosforilación del extremo 5' con fosfatasa de intestino de ternera (CIP). El vector de la cadena pesada pCI-GNX-8.H3 es escindido con BglII y NgoMIV. El fragmento BglII-NgoMIV, que contiene el promotor del CMV, ADNc de la cadena pesada de longitud completa y poliA del SV40, se recupera por extracción en gel y se introduce en el vector de la cadena ligera linealizado por ligación de los extremos romos para formar pClick-GNX-8 neo. Después, el vector pClick-GNX-8 DHFR se genera eliminando el gen de neomicina con escisión con NgoMIV/ClaI a partir de pClick-GNX-8 neo y sustitución por el gen de DHFR. El minigen de DHFR se escinde del vector pdhfr3.2 (ATCC, n° 37166) por digestión con HindIII/Sall, y se separa y se recupera por extracción en gel. Ambos fragmentos se tratan con Klenow para dar extremos romos, y entonces el gen de DHFR se liga al fragmento pClick-GNX-8 neo escindido con NgoMIV/ClaI por ligación de los extremos romos.

35 Tabla 3 Cebadores y secuencias

Secuencia (5' a 3')	SEC ID NO
ELLGG	1
MISRT	2
GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG	3
GTG CAC GCC GCT GGT CAG GGC GCC TG	4
GGT GCC AGG GGG AAG ACC GAT GG	5
CGA ATT CAC CAT GGC TGT CTC CTT CCT C	6
GCT CTA GAT CAT TTA CCC GGA GAC AGG	7
ACT CCC AGT TCA ATT ACA GC	8
TGG TTT GTC CAA ACT CAT C	9
GCA TGT ACT AGT TTT GTC ACA AGA TTT GGG	10
GTT TTC CCA GTC ACG AC	11
GCG AAT TCA CCA TGG CCT GGA CTT CAC	12
GCC GTA CGT AGG ACA GTG ACC TTG GTT C	13
GDSVSSKVA	18
GGGACAGTGTCTCTAGCAA GAGTGTGCT	19
TYYSKWYN	20
ACATACTACAGGTCCAAGT GGTATAAT	21
ARNFDY	22
GCAAGAACTTTGACTAC	23
TGAVTTNNY	24
ACTGGGGCTGTTACAACT AATAACTAT	25
ATS	26
GCTACCAGC	27
ALWYNTHFV	28
GCTCTATGGTACAACACCC ATTTTGTT	29

SEC ID NO: 14

Longitud: 318

Tipo: ADN

5 (cadena pesada, región variable)

GGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGG  
GGACAGTGTCTCTAGCAAGAGTGTTGCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCC  
CCATTGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGT  
GGTATAATGAATATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAATCC  
AGACACATCCAAGAACCAGTTCTCCCTGCACCTGAACTCTGTGACTCCCG  
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAACTTTGACTACTGGGGCCA  
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCC

SEC ID NO: 15

Longitud: 106

Tipo: aminoácido

(cadena pesada, región variable)

10

GLVKPSQTLSTCAISGDSVSSKSVAWNWIRQSPLRGLEWLGRTYYRSKWY  
NEYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLHLNSVTPEDTAVYYCARNFDYWGQGT  
15 VTVS

SEC ID NO: 16

Longitud: 300

Tipo: ADN

(cadena ligera, región variable)

20

CTCACACAGCACCTGGTGGAACAGTCATACTCACTTGTGCTCAAGTAC  
TGGGGCTGTTACAATAACTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCA  
GATCATTTATTCACTGGTCTAATAGATGCTACCAGCAACCGAGTTCAGG  
TGTTCCCTGTCAGATTCTCCGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCA  
CCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGATGCAATGTATTTCTGTGCTCT  
ATGGTACAACACCCATTTTGTTCGCGGTGGAACCAAGGTCACCTGTCC  
TA

SEC ID NO: 17

Longitud: 100

Tipo: aminoácido

(cadena ligera, región variable)

25

LTTAPGGTVILTCRSSTGAVTTNNYANWVQEKPDHLFTGLIDATSNRVPGVP  
VRFSGLIGDKAALITGAQTEDDAMYFCALWYNTHFVFGGGTKVTVL

Un vez que las cadenas ligera y pesada se secuencian, los ácidos nucleicos pueden ser recodificados para optimizar la expresión, por ejemplo, en células hospedantes humanas específicas.

35

**Ejemplo 10: transfectomas**

Se cultivan células NS0 a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. Las células se mantienen en fase de crecimiento exponencial, y el medio se cambia el día antes de la transfección. El día de la transfección, se lavan  $40 \times 10^6$  células. Entonces, 10 µg de ácido nucleico linealizado que contiene, por ejemplo, ADN de la cadena ligera y ADN de la cadena pesada linealizado, se añaden a la suspensión celular (el volumen de ADN total debe ser menor de 50 µl), y el cultivo se incuba en hielo durante 15 minutos. La mezcla de ADN y células se transfiere a una cubeta enfriada (0,4 cm), y se aplica un pulso eléctrico (750 V y 25 µF). La cubeta se pone en hielo inmediatamente después del pulso eléctrico, y se mantiene en hielo durante 10 a 15 minutos. Las células se recogen y se siembran en placas. Las células se incuban en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% durante 12 a 16 días o hasta que aparezcan las colonias. El sobrenadante de las colonias celulares o células mantenidas en cultivo en suspensión se ensayan por ELISA, y los transfectomas positivos son clonados en medio reciente. Para seleccionar adicionalmente los transfectomas positivos, se lleva a cabo ELISA de titulación o el ensayo de Biacore. Los transfectomas expandidos se mantienen en matraces de agitación, y el anticuerpo o derivado del mismo se recoge del sobrenadante.

40

45

**Ejemplo 11: farmacocinética**

Las ratas se distribuyen al azar en dos grupos (cuatro ratas/grupo). Los animales reciben 1 o 10 mg/kg de GNX-8 como una única inyección de bolo i.v. vía de una vena de la cola. Se recogen muestras de sangre a 0, 5, 15 y 30 minutos, y 1, 2, 4, 6, 24, 30, 72, 144, 168, 216, 240, 312, 336 y 360 horas. Se cosecha el suero y se almacena a 20°C, hasta el ensayo de concentración de GNX-8. La concentración de GNX-8 se determina por ELISA.

El GNX-8 es marcado radiactivamente con <sup>131</sup>I usando el método IODO-Gen.

Se usan ratones atómicos para estudios de formación de imágenes y de biodistribución in vivo. Se inoculan subcutáneamente cinco millones de células Colo205. Cuando el tumor alcanza un tamaño de 0,5 g, se realiza el estudio de biodistribución. Para el estudio de biodistribución, se inyecta a los ratones en la vena de la cola con 10 µCi/2,3 µg de GNX-8 marcado con <sup>131</sup>I. Se sacrifica a cinco ratones a 6, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inyección. Se toman muestras de sangre poco antes de que se sacrifique a los ratones. Los tumores y órganos (cerebro, piel, músculo, hueso, corazón, pulmón, páncreas, ojo, glándula suprarrenal, cola, bazo, riñón, hígado, vejiga, estómago, intestino delgado e intestino grueso) se retiran de inmediato y se pesan. La presencia del anticuerpo marcado radiactivamente en el tumor, órgano y sangre se cuenta por separado en un contador γ (Packard). Los patrones se cuentan cada vez con los tejidos y tumores. Las radiactividades de los tejidos se expresa como el porcentaje de dosis inyectada por gramo de órgano (% de ID/g).

Se realizan estudios de formación de imágenes en un sistema de formación de imágenes para animales X-SPECT con tomografía computerizada de emisión de fotones individuales microSPECT (Gamma Medica Inc. USA) y tomografía computerizada de rayos X microCT. Ratones atómicos que poseen tumores Colo205 son inyectados i.v. con 200 mCi/5,5 mg/100 ml de GNX-8 marcado con <sup>131</sup>I vía la vena de la cola. Las imágenes se adquieren a 1, 6, 24, 48, 72 y 96 horas. Se llevan a cabo estudios de farmacocinética (PK) para GNX-8 en ratas, ratones SCID y ratones atómicos, después de una única administración i.v. La concentración de GNX-8 en el suero se analiza por ELISA.

Un modelo de dos compartimentos proporciona un buen ajuste a los datos, y genera los parámetros de PK resumidos en las Tablas 4 y 5. Se observa un incremento en C<sub>max</sub> relacionado con la dosis tras una única administración i.v. de 1,0 y 10 mg/kg de GNX-8 en ratas. GNX-8 es aclarado del suero en una semivida terminal de 3,81 y 4,98 días a una dosis de 1 y 10 mg/kg, respectivamente.

Los parámetros farmacocinéticos de GNX-8 tras la administración en ratones atómicos y ratones SCID, con o sin ratones que poseen tumores Colo205, presentaron un T<sub>1/2</sub> que es casi de un día en ambas especies con tumores. Para los animales que no poseen tumores, los valores de T<sub>1/2</sub> son 58,09 h en ratones SCID, y 98,31 h en ratones atómicos, respectivamente. A partir de los parámetros farmacocinéticos, el T<sub>1/2</sub> es mucho más prolongado en los ratones que no poseen tumores que en los ratones que poseen tumores.

**Tabla 4 Parámetros farmacocinéticos en ratas**

Parámetro	1 mg/kg i.v.	10 mg/kg i.v.
T <sub>max</sub> (minutos)	5	5
C <sub>max</sub> (ug/ml)	9,49	102,08
T <sub>1/2</sub> terminal (día)	3,81	4,98

**Tabla 5 Parámetros farmacocinéticos en ratones SCID y ratones atómicos (administración i.v. de 5 mg/kg de GNX-8)**

con tumores	Ratones SCID		Ratones atómicos	
	+	-	+	-
C <sub>max</sub> (ug/ml)	76,45	72,52	76,5	84,4
T <sub>max</sub> (min)	5	5	5	30
T <sub>1/2</sub> (eliminación) (h)	22,99	58,09	26,73	98,31

Se realizan estudios de biodistribución en ratones atómicos que poseen xenoinjertos de Colo205 para evaluar la actividad de selección de la diana tumoral in vivo y la especificidad de GNX-8.

El nivel más alto de radiactividad de GNX-8 marcado con <sup>131</sup>I se detecta en el plasma en todos los puntos de tiempo, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h. A 6 h, aproximadamente 60% de las dosis inyectadas por gramo (% de ID/g) son detectadas en el plasma. A 48, 72 y 96 horas, el % de ID/g para el plasma fue de aproximadamente 20%. El nivel en plasma es significativamente mayor que en otros órganos, cerebro, piel, músculo, hueso, corazón, pulmón, páncreas, ojo, glándula suprarrenal, cola, bazo, riñón, hígado, vejiga, estómago, intestino delgado e intestino grueso, en el que el % de ID/g en todos los puntos de tiempo en todos los órganos no excede 5% de ID/g. La radiactividad disminuye con el tiempo en el plasma y en los otros órganos, salvo en el tumor. La radiactividad en el plasma disminuye en aproximadamente 70% entre 6 y 96 horas.

La radiactividad del tumor es inicialmente mayor que en los órganos normales. La captación más alta del tumor se observa a las 48 horas después de la inyección de GNX-8 marcado con  $^{131}\text{I}$ , y mantiene un estado estacionario mientras la radiactividad de los otros órganos disminuye. Por lo tanto, las relaciones tumor/órgano aumentan en otros órganos. Se observa radiactividad que decrece rápidamente en plasma, corazón, pulmón, glándula suprarrenal, cola, bazo, riñón e hígado entre 6 y 24 horas. Por otra parte, las relaciones tumor/plasma aumentan aproximadamente 4 veces de 6 a 96 horas después de la inyección. No se observa acumulación de GNX-8 marcado con  $^{131}\text{I}$  en el riñón.

La actividad de selección de la diana tumoral in vivo en ratones atímicos que poseen tumores Colo205 se estudia mediante análisis de formación de imágenes. Se realiza un experimento de transcurso de tiempo para monitorizar la distribución de GNX-8 marcado con  $^{131}\text{I}$ . El resultado indica también que la mayor parte del GNX-8 marcado con  $^{131}\text{I}$  se localiza en la sangre, y la selección de la diana tumoral es claramente visible de 24 a 72 horas después de la inyección.

Los datos *in vivo* indican que la mayor parte de GNX-8 es retenido en la sangre después de la inyección. No existe unión no específica significativa en diversos órganos normales. Además, GNX-8 se dirige al tumor de Colo205 rápidamente después de la inyección i.v., y mantiene el marcaje en un nivel de estado estacionario durante 96 horas.

#### Ejemplo 12: toxicidad

Se realiza un estudio de toxicidad de dosis única en ratones machos y hembras BALB/c AnN Crl BR (6 ratones/grupo) de 8 a 9 semanas. Se inyecta i.v. a los ratones con GNX-8 a una dosis de 150 mg/kg o con vehículo solo (PBS). El peso corporal para todos los ratones se mide en los días 1, 8 y 16 del estudio, antes del sacrificio. Se observa diariamente a los ratones en busca de signos de morbilidad.

Se lleva a cabo un estudio de toxicidad de dosis repetida en ratas Sprague-Dawley Crl CD (SD) machos (6 ratas/grupo) de 8 semanas. A cada grupo se le administra vehículo (PBS) o 3, 15 o 75 mg/kg/dosis de GNX-8, dos veces por semana durante 4 semanas. Se inspecciona diariamente a todos los animales en busca de mortalidad, y se registra individualmente cualquier hallazgo. Se pesa semanalmente a las ratas durante los períodos de pretratamiento y de tratamiento, y se obtiene un peso corporal final en ayunas durante la noche en el sacrificio terminal. Se recogen muestras de sangre en el sacrificio terminal, y se evalúan para determinar parámetros de hematología y química clínica. La significancia de las diferencias en peso corporal y todos los parámetros ensayados se determina mediante la prueba de la *t* de Student.

Para determinar la reactividad cruzada de GNX-8 sobre tejidos humanos normales, se usa una dosis muy alta (150  $\mu\text{g/ml}$ ) de GNX-8 biotinilado. Una matriz de tejidos con 72 tejidos humanos (24 tipos de órganos normales tomados de 3 individuos humanos normales) (US Biomax, FDA 801-1) se tiñe con GNX-8. En base a los resultados de la  $C_{\text{máx}}$  del estudio de farmacocinética, GNX-8 se usa a 150  $\mu\text{g/ml}$  para garantizar que GNX-8 a la  $C_{\text{máx}}$  no tenga reactividad cruzada seria con los tejidos humanos normales. Dicha concentración es mucho mayor que la que se usa regularmente en estudios inmunohistoquímicos.

Se observa tinción débil a moderada de GNX-8 en varios tejidos humanos de origen epitelial, incluyendo el epitelio de la mucosa del tubo digestivo, células del epitelio de los conductos lactíferos y células queratinizadas del epitelio escamoso estratificado. De acuerdo con los hallazgos previos de Finstad et al. (Clin. Cáncer Res., 3: 1433-1442, 1997), los anticuerpos introducidos en la sangre circulante muestran localización específica frente a la célula de carcinoma, y no se acumularon en las células epiteliales normales adyacentes positivas para el antígeno. Asimismo, los anticuerpos no atraviesan la membrana basal. Por lo tanto, no se considera un perjuicio la tinción en las células epiteliales de los conductos en el tejido normal por GNX-8.

Se llevan a cabo otros dos estudios para examinar la reactividad cruzada de GNX-8 sobre células sanguíneas humanas normales. Todas las células sanguíneas ensayadas de los cuatro donantes del tipo sanguíneo (ABO) muestran respuesta negativa con GNX-8. Los resultados apoyan la observación de que GNX-8 no se une a las células sanguíneas. Por lo tanto, el GNX-8, administrado al sistema circulatorio, no debe causar daño a las células sanguíneas.

Para consignar la seguridad de GNX-8 in vivo, se llevan a cabo dos estudios para determinar los efectos de toxicidad aguda y subaguda.

La toxicidad de la dosis única de GNX-8 se ensaya en ratones BALB/c a una dosis de 150 mg/kg. Se observa a los ratones una vez al día, y no se encuentran muertes antes del sacrificio programado. Todos los ratones aumentan de peso durante todo el estudio, y no existen diferencias significativas en el aumento de peso corporal medio entre el grupo de tratamiento con GNX-8 y el grupo de control.

La toxicidad de la dosis repetida de GNX-8 se lleva a cabo en ratas Sprague Dawley Crl CD. Se distribuyen 6



- animales de 8 semanas en los grupos. A un grupo se le administra vehículo (PBS) dos veces por semana durante cuatro semanas. Los grupos 2, 3 y 4 reciben GNX-8 en PBS a 3, 15 y 75 mg/kg/dosis, respectivamente, dos veces por semana durante cuatro semanas. Se examina a todos los animales diariamente en busca de mortalidad, y se registran todos los hallazgos. Se pesa semanalmente a las ratas durante los períodos de pre-tratamiento y de tratamiento, y se obtiene un peso corporal final en ayunas durante la noche en el sacrificio terminal. Se recogen muestras de sangre en el sacrificio y se evalúan para determinar parámetros de hematología y química clínica. La significación de las diferencias en peso corporal y todos los demás parámetros medidos se analizan por la prueba de la t de Student.
- 10 No existen signos clínicos de toxicidad relacionados con el tratamiento con GNX-8. El análisis del aumento de peso corporal final no indica diferencia alguna entre los grupos de tratamiento y de control. Unas muestras de sangre del grupo de control y del grupo de dosis elevada se toman antes de la eutanasia después de un período de ayuno durante toda la noche, y se analizan para determinar perfiles de química clínica y hematología.
- 15 No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de dosis elevada y los grupos de control para cantidad de hemoglobina, hematocrito, número de RBC, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media. Los resultados no indican que se induce toxicidad hematológica por la administración repetida de GNX-8 a dosis elevada.
- 20 Para los análisis de química clínica, los valores medios para los parámetros para los grupos de control y de dosis elevada se indican en la Tabla 6. Se aprecia un incremento estadísticamente significativo en proteínas totales en el grupo de dosis elevada, que podría resultar de las inyecciones repetidas de anticuerpo a dosis elevada. Además, se observa también un ligero incremento en albúmina. Sin embargo, el valor está aún dentro del intervalo de límites normales para las ratas. Los datos de química clínica no muestran lesión notable a la función de excreción y del metabolismo después de la inyección repetida de GNX-8 a dosis elevada.
- 25 Tanto los análisis de química clínica como de hematología verifican la seguridad de la administración repetida de GNX-8 a dosis elevada durante una duración de cuatro semanas.

30 Tabla 6 Análisis de química clínica

Secciones	Control		Dosis elevada	
	Media	SD	Media	SD
albumina (g/dl)	3,3	0,4	3,9	0,2
ALT(GPT) (U/l)	118,6	50,0	67,6	6,0
AST(GOT) (U/l)	372,0	203,8	323,3	118,2
bilirrubina total (mg/dl)	0,3	0,1	0,6	0,2
BUN (mg/dl)	12,3	5,8	11,2	1,5
Ca (mg/dl)	11,0	0,2	11,2	0,2
Cl <sup>-</sup> (mmol/l)	108,0	2,1	106,0	2,2
colesterol (mg/dl)	96,6	9,2	86,4	18,7
creatinina (mg/dl)	1,2	0,7	1,1	0,5
K <sup>+</sup> (mmol/l)	4,9	0,6	4,9	0,5
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	144,6	2,7	148,2	4,2
fósforo (mg/dl)	8,4	0,6	7,4	0,9
proteína total (g/dl)	6,3	0,3	7,1	0,2

**Ejemplo 13: aumento de escala**

- 35 Para obtener una línea de células estable para la producción de GNX-8 a gran escala, se obtienen líneas de células NS0 y CHO que expresan GNX-8 recombinante (rGNX-8). De forma breve, los ADNc que codifican tanto las cadenas ligera como pesada de GNX-8 se clonan a partir del hibridoma original. Los genes del anticuerpo aislados se reensamblan entonces en vectores de expresión. El peso molecular de rGNX-8 purificado de los medios acondicionados por células NS0 transfectadas se confirma por SDS-PAGE. La especificidad, actividad de unión y eficacia de rGNX-8 y el hibridoma de GNX-8 original se comparan por HPTLC, inmunotinción, citometría de flujo y ensayo de CDC.
- 40 No existen diferencias entre los anticuerpos GNX-8 recombinante y original.
- 45 Los perfiles de N-glucosilación de rGNX-8 y GNX-8 se analizan entonces por MS MALDI.
- Los datos ilustran un patrón de azúcar enlazado mediante N altamente similar entre los dos anticuerpos. Casi todos los N-glucanos de los dos anticuerpos contienen la estructura de fucosilación central, pero no ácidos siálicos terminales.

50

5 Unas células de ovario de hámster chino deficientes en dihidrofolato reductasa (CHO/dhfr) (ATCC, CRL-9096) se mantienen en IMDM que contiene FBS al 5% y se suplementan con hipoxantina 100 nM y timidina 16 µM. Para preparar líneas de células para la producción de GNX-8 recombinante, el vector de expresión pClick-GNX-8 DHFR es linealizado por BamHI, y la concentración del ADN recuperado en disolución se determina por absorbancia a OD<sub>260</sub>. Aproximadamente 1,2 x 10<sup>6</sup> células CHO/dhfr- son transfectadas con 10 µg de ADN linealizado y 30 µl de reactivo de transfección Fugene6 (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas, el medio de cultivo se sustituye por suero de fetal bovino dializado al 5% que contiene IMDM, para la selección de los transfectantes. La selección se prolonga durante aproximadamente dos semanas hasta que se obtienen colonias estables. Las colonias múltiples se recogen y se cultivan bajo el mismo medio selectivo en placas de 48 pocillos. Los clones de CHO individuales se seleccionan para la expresión de rGNX-8 por ELISA específico de antígenos, usando anticuerpos anti-IgG(Fc) humana marcados con HRP como el segundo anticuerpo.

10 Un clon de CHO que expresó niveles elevados de anticuerpo se selecciona para la amplificación génica subsiguiente con metotrexato (MTX). La amplificación génica en 10 nM de MTX da como resultado un incremento de más de 30 veces la secreción de rGNX-8. El clon de CHO estable se denomina CHO-rGNX-8.5M10.

15 Las células CHO-rGNX-8.5M10 son adaptadas después a cultivo libre de suero en matraces de agitación, y alcanzan un rendimiento máximo de aproximadamente 120 µg/ml de GNX-8 durante un cultivo de 14 días. El sobrenadante de cultivo se recoge y se purifica por cromatografía de proteína A. El anticuerpo rGNX-8 purificado del sobrenadante de cultivo de CHO por cromatografía de proteína A revela las bandas de péptidos de la cadena pesada y de la cadena ligera esperadas en SDS-PAGE.

**Listado de secuencias**

25 <110> GLYCONEX

<120> ANTICUERPO ANTIGLUCOESFINGOLÍPIDO DE TIPO I EXTENDIDO, DERIVADOS DEL MISMO Y UTILIZACIÓN

30 <130> 070824-25010100

<140>

<141>

35 <160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

40 <211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

**Glu Leu Leu Gly Gly**

45 **1 5**

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<400> 2

**Met Ile Ser Arg Thr**

**1 5**

55 <210> 3

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 3

gcatgtacta gttttgtcac aagatttggg

5	<210> 4 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 4 gtgcacgccg ctggtcaggg cgctg	26
15	<210> 5 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 5 ggtgccaggg ggaagaccga tgg	23
25	<210> 6 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 6 cgaattcacc atggctgtct ccttcctc	28
35	<210> 7 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
45	<400> 7 gctctagatc atttaccgg agacagg	27
50	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
55	<400> 8 actcccagtt caattacgc	20
60	<210> 9 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
65	<400> 9 tggttgtcc aaactcatc	19

ES 2 549 877 T3

5	<210> 10 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 10 gcatgtacta gtttgcac aagattggg	30
15	<210> 11 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
20	<400> 11 gtttcccag tcacgac	17
25	<210> 12 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
30	<400> 12 gcgaattcac catggcctgg acttcac	27
35	<210> 13 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
40	<400> 13 gcbgtacgta ggacagtac ctgggtc	28
45	<210> 14 <211> 318 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
	<400> 14 ggactggtga agccctcgca gaccctctca ctacactgtg ccatctccgg ggacagtgtc	60
	tctagcaaga gtgttgcttg gaactggatc aggcagtccc cattgagagg ccttgagtgg	120
	ctgggaagga catactacag gtccaagtgg tataatgaat atgcagtatc tgtgaaaagt	180
	ogaataacca tcaatccaga cacatccaag aaccagttct ccctgcacct gaactctgtg	240
	actcccgagg acacggctgt gtattactgt gcaagaaact ttgactactg gggccagggg	300
55	accctggtca ccgtctcc	318

ES 2 549 877 T3

<210> 15  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 15  
 Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser  
 1 5 10 15

Gly Asp Ser Val Ser Ser Lys Ser Val Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln  
 20 25 30

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

Lys Trp Tyr Asn Glu Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile  
 50 55 60

Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu His Leu Asn Ser Val  
 65 70 75 80

Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Phe Asp Tyr  
 85 90 95

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 100 105

10

<210> 16  
 <211> 300  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 16  
 ctccaccacag cacctggtgg aacagtcata ctcaactgtc gctcaagtac tggggctggt 60  
 acaactaata actatgccaa ctgggtccaa gaaaaaccag atcatttatt cactggtcta 120  
 atagatgcta ccagcaaccg agttccaggt gttcctgtca gattctcgg ctcctgatt 180  
 ggagacaagg ctgccctcac catcacagg gacacagactg aggatgatgc aatgtatttc 240  
 tgtgctctat ggtacaacac ccattttggt ttcggcgggtg gaaccaaggt cactgtccta 300

20

<210> 17  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

30

<400> 17

ES 2 549 877 T3

Leu Thr Thr Ala Pro Gly Gly Thr Val Ile Leu Thr Cys Arg Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Gly Ala Val Thr Thr Asn Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys  
20 25 30

Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Asp Ala Thr Ser Asn Arg Val  
35 40 45

Pro Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala  
50 55 60

Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Asp Ala Met Tyr Phe  
65 70 75 80

Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Thr His Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
85 90 95

Val Thr Val Leu  
100

5 <210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 18  
Gly Asp Ser Val Ser Ser Lys Ser Val Ala  
1 5 10

15 <210> 19  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 19  
ggggacagtg tctctagcaa gagtgtgct 30

25 <210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 20  
Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn  
1 5

35 <210> 21  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>



<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 27  
 gctaccagc 9

<210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 28  
**Ala Leu Trp Tyr Asn Thr His Phe Val**  
**1 5**

20 <210> 29  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 29  
 gctctatggt acaacaccca ttttgt 27

30



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo monoclonal humano o parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un epítipo que comprende un glucoesfingolípido de cadena de tipo I extendido que comprende Le<sup>b</sup>, en el que dicho epítipo es expresado en una célula cancerosa, en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo no se une a eritrocitos humanos, y en el que el anticuerpo presenta una región variable de cadena pesada que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 15, y una región variable de cadena ligera que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 17.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que no se une a Le<sup>x</sup>.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1, que no se une a Le<sup>y</sup>-Le<sup>x</sup>.
- 15 4. Anticuerpo según la reivindicación 1, que lisa 50% de células Colo205 en un ensayo de ADCC a una relación E/T de 20/1 a una concentración de anticuerpo de 5 µg/ml.
5. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicha célula cancerosa expresa Le<sup>b</sup>-Le<sup>a</sup>.
- 20 6. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicha célula cancerosa es una célula epitelial.
7. Anticuerpo según la reivindicación 6, en el que dicha célula epitelial comprende colon, recto, esófago, pulmón, próstata, mama o páncreas.
- 25 8. Anticuerpo según la reivindicación 1, que es un scFv.
9. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende una cadena κ.
10. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende una cadena γ.
- 30 11. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la región variable de cadena pesada es codificada por la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 14.
12. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que la región variable de cadena ligera es codificada por la secuencia nucleotídica de SEC ID nº 16.
- 35 13. Composición que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1 y por lo menos uno de un agente farmacológicamente activo, un vehículo, un excipiente y unos diluyentes farmacéuticamente aceptables.