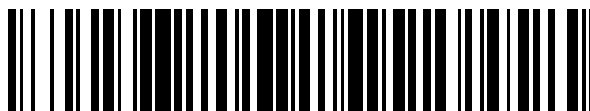


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 290**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006** **E 06829616 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 1960432**

54 Título: **Anticuerpo anti-ICAM inductor de apoptosis**

30 Prioridad:

**12.12.2005 GB 0525214**

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

**14.07.2016**

73 Titular/es:

**BIOINVENT INTERNATIONAL AB (100.0%)**  
**Sölvegatan 41**  
**S223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**FRENDÉUS, BJÖRN y**  
**CARLSSON, ROLAND**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 577 290 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 anti-ICAM inductor de apoptosis.

5 La invención se refiere a moléculas que participan en la inducción de la apoptosis, a métodos y a composiciones farmacéuticas para la inducción de la apoptosis y a usos de los mismos.

Los anticuerpos se han convertido recientemente en las proteínas terapéuticas de elección para dirigirse al cáncer, pero también para el tratamiento de otras indicaciones (Brekke y col., *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 52-62). La llegada de la ingeniería de anticuerpos ha proporcionado las herramientas para generar anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de fagos sintéticos que muestran una reducción de la inmunogenicidad y un aumento de la especificidad y la afinidad debido a su naturaleza humana y a su mayor diversidad (Weiner y col., *Nat Biotechnol* 2005; 23:556-7). Las bibliotecas no tratadas previamente son particularmente atractivas, ya que se pueden usar para el aislamiento de anticuerpos de cualquier especificidad, incluyendo los autoantígenos (Griffiths y col., *Embo J* 1993; 12:725-34), independientes de las inmunizaciones y de la reconstrucción de nuevas bibliotecas. Los receptores de la superficie celular constituyen, con mucho, el grupo más exitoso de antígenos dirigidos por los fármacos terapéuticos contemporáneos, incluyendo inhibidores de moléculas pequeñas y anticuerpos. Son de particular interés los receptores de la superficie celular que se expresan exclusivamente o que muestran un mayor nivel de expresión en una célula diana y que, además, son capaces de transmitir señales de muerte o de supervivencia a la célula. Dichos receptores expresados diferencialmente con propiedades intrínsecas de señalización permiten la dirección basada en anticuerpos de células infectadas con microbios, transformadas o que funcionan mal por otra causa.

Para el tratamiento de tumores, son de particular interés los anticuerpos que tienen la capacidad de inducir la apoptosis en una célula tumoral diana ignorando el tejido normal. Hay varios de estos anticuerpos en uso que han sido registrados por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) y que proporcionan alternativas a los tratamientos convencionales contra el cáncer, por ejemplo, contra el linfoma (rituximab dirigido a CD20) o contra el cáncer de mama (trastuzumab o cetuximab dirigidos a Her-2 y EGFR, respectivamente).

También hay otros anticuerpos con efectos que inducen la apoptosis actualmente en desarrollo clínico. Sin embargo, aunque estos anticuerpos demuestran efectos beneficiosos en los pacientes o en los ensayos con animales, todavía existe una necesidad clínica sin cubrir.

La inmunoglobulina anti-idiotipo dirigida a los tumores de linfocitos B fue la primera terapia de anticuerpos monoclonales realizada en el ser humano (Miller y col., *N Engl J Med* 1982; 306:517-22). La destrucción de las células tumorales por dichos medios de administración pasiva de anticuerpos (Riechmann y col. *Nature* 1988; 332:323-7) o de vacunación activa con la propia proteína de inmunoglobulina tumoral de los pacientes (Kwak y col *N Engl J Med*. 1992; 327: 1209-1215), ha demostrado conferir la regresión del tumor o la latencia del tumor en pacientes con diferentes tipos de tumores malignos de linfocitos B. Un informe más reciente describe la generación de anticuerpos anti-idiotipo totalmente humanos usando ratones transgénicos deficientes en la producción de anticuerpos de ratón y expresando locus de cadenas de anticuerpos humanos seleccionados Suarez y col. *Mol Immunol* 2004; 41:519-26).

En la presente invención, se ha usado un método de bioselección de competencia, en el que el antígeno de la célula diana, en forma de células enteras, y el antígeno de células sustractoras en exceso, en forma de vesículas de la membrana, se exponen al mismo tiempo a la biblioteca de fagos de anticuerpos n-CoDeR® sin tratamiento previo (WO 2004/023140; Soderlind y col. *Nat Biotechnol* 2000;18:852-6), para recuperar y posteriormente ensayar los fragmentos de los anticuerpos con una excelente selectividad hacia las células diana de linfoma B. Además, la funcionalidad de las moléculas de unión seleccionadas quedó demostrada por la capacidad de los anticuerpos ensayados para inducir la apoptosis en las células diana, pero no en las células no diana.

Las especificidades identificadas de los anticuerpos incluyen HLA-DR/DP (el anticuerpo B1 de la invención) e IgM de la superficie (el anticuerpo C11 de la invención), así como ICAM-1 (el anticuerpo B11 de la invención), una molécula de adhesión no asociada previamente a la inducción de la apoptosis. Los anticuerpos aislados tenían afinidades en el intervalo subnanomolar a nanomolar, convirtiéndolos directamente en posibles opciones para la terapia con anticuerpos dirigidos.

**Sumario de la invención**

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de inducción de la apoptosis en una célula diana que comprende las etapas:

- a. proporcionar una o más células diana que presenten el antígeno de superficie celular ICAM-1;
- b. proporcionar una o más moléculas de unión que se unan selectivamente al ICAM-1 de superficie celular y que, al unirse a ICAM-1, induzcan la apoptosis de la célula diana;
- c. exponer las células diana de (a) a las moléculas de unión de (b) para inducir la apoptosis en las células diana.

En el que la molécula de unión es una molécula de anticuerpo que tiene regiones variables que tienen las secuencias de la Figura 10.

En la divulgación, se proporciona un método de inducción de la apoptosis en una célula diana que comprende las etapas:

- a. proporcionar una o más células diana que presenten el antígeno de superficie celular HLA-DR/DP e/o IgM de superficie;
- b. proporcionar una o más moléculas de anticuerpo que se unan selectivamente al HLA-DR/DP de superficie celular e/o IgM de superficie y que, al unirse a HLA-DR/DP e/o IgM de superficie, induzcan la apoptosis de la célula diana;
- c. exponer las células diana de (a) a las moléculas de anticuerpo de (b) para inducir la apoptosis en las células diana.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una molécula de unión que se une selectivamente a ICAM-1 de superficie celular y que, al unirse a ICAM-1, induce la apoptosis de la célula diana y que es un anticuerpo humano que tiene las regiones variables que tienen las secuencias de la Figura 10.

ICAM-1 también se denomina CD54, pero a los efectos de la presente solicitud, se usará la denominación ICAM-1.

Las moléculas de unión pueden derivar de anticuerpos, y se basan en el armazón de los anticuerpos [Clackson T. y col., *Nature*. 15 de agosto de 1991; 352 (6336): 624-8; Marks J. D. y col., *J Mol Biol*. 5 de diciembre de 1991; 222(3): 581-97] que se ha usado ampliamente en muchas bibliotecas, pero las moléculas de unión también pueden derivarse de otros armazones moleculares tales como el armazón de fibronectina [Weng S y col., *Proteomics*. Enero de 2002; 2(1):48-57] y el armazón de la proteína A [Nord K., y col., *Nat Biotechnol*, agosto de 1997; 15(8):772-7, Hogbom M. y col., *Proc Natl Acad Sci. EE.UU.* 18 de marzo de 2003; 100(6): 3191-6]. Cada uno de estos armazones puede tener sus ventajas dependiendo de la aplicación, y el armazón de anticuerpo, por poner un ejemplo, se puede usar ventajosamente para la creación de variabilidad indistinguible de la variabilidad natural.

Se conoce muy bien la estructura básica del anticuerpo, el armazón más usado. En principio, una estructura de marco que comprende cadenas beta ordenadas en dos láminas presenta un conjunto de bucles variables, las denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que tienen la capacidad de unirse a moléculas de antígeno. Aunque los anticuerpos pueden variar en la estructura del armazón, la variabilidad más amplia se observa en las CDR. La gran variabilidad en y entre los anticuerpos, es la base de su capacidad para interactuar, de manera específica, con, en principio, todos los tipos de estructuras moleculares. Debido a esta capacidad, los anticuerpos se han usado ampliamente para la generación de aglutinantes específicos con aplicabilidad en la investigación, en el diagnóstico/pronóstico de enfermedades y como agentes terapéuticos específicos de estructuras diana definidas [Borrebaeck C. A. y Carlsson R., *Curr Opin Pharmacol*. Agosto de 2001; 1(4):404-8].

Otras moléculas de unión distintas de los anticuerpos son las que tienen estructuras de armazón con un alto grado de estabilidad aún permitiendo la introducción de variabilidad en ciertas posiciones. Un ejemplo de otra molécula de unión es un dominio de fibronectina y un dominio de proteína A de gran tamaño, de 58 aminoácidos, que toleran la variabilidad. También hay otros pliegues moleculares que permiten un cierto grado de variación. Dichos ejemplos incluyen moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) de clase I y II, y, recientemente, se ha identificado una nueva clase de moléculas, denominadas defensinas, como similares en la estructura básica, aunque albergan una extensa variabilidad de la secuencia en y entre los miembros de la familia de genes, lo que indica que son aptas como armazones para albergar diversidad molecular. Además, el/los ligando/s natural/es, por ejemplo, el LFA-1 en el caso del ICAM-1 como molécula diana, o las variantes recombinantes del mismo, pueden constituir moléculas de unión específicas capaces de inducir la apoptosis en células diana.

Además, la molécula de unión puede ser cualquier molécula que se una selectivamente al ICAM-1 de superficie celular de una célula diana y que, al unirse, induzca la apoptosis de la célula diana.

La presente detección recuperó un anticuerpo (B11) específico de ICAM-1- un receptor no asociado previamente a la apoptosis y al que no se le atribuyen propiedades de señalización negativas intrínsecas en las células.

La identificación de ICAM-1 como una molécula inductora de la apoptosis fue un resultado directo del diseño de la detección para aislar especificidades hacia todos los receptores de superficie expresados diferencialmente entre células diana y no diana, con independencia de y sin conocimiento previo de su respectiva identidad. La muerte celular inducida por ICAM-1 se ha verificado como un proceso apoptótico activo que implicaba la despolarización de la membrana mitocondrial. La despolarización de la membrana mitocondrial se ha descrito anteriormente tanto para la apoptosis dependiente de la caspasa como para la independiente de la caspasa (Nagy y col. *J Mol Med* 2003; 81:757-65).

Los presentes hallazgos demuestran además que el epítipo unido por el anticuerpo B11 se expresa en tejido de linfoma B de diferente origen, y que está regulado positivamente en ciertas células de linfoma B en comparación con los leucocitos de sangre periférica en reposo. Es importante destacar que, además de las células de linfoma B, también las células de carcinoma que expresaban ICAM-1 sufrieron apoptosis al someterse al anticuerpo B11 específico de ICAM-1 *in vitro* (véase el Ejemplo 6).

Estudios previos han demostrado la expresión restringida de ICAM-1 en tejidos humanos normales (Smith y col. *J Clin Pathol* 1990; 43:893-900). ICAM-1 está implicado en la adhesión de célula a célula, y desempeña un papel importante en las respuestas inmunitarias y en la inflamación a través de la unión con su receptor LFA-1. Los anticuerpos dirigidos a ICAM-1 se han usado para interferir con las respuestas inmunitarias patológicas y la inflamación. La administración *in vivo* de un anticuerpo monoclonal anti-ICAM-1 murino en monos *Cynomolgus* (Cosimi y col., *J Immunol* 1990; 144: 4604-12) o el uso en ensayos clínicos de pacientes humanos con artritis reumatoide o pacientes receptores de trasplante de riñón, también ha puesto de manifiesto la ausencia de toxicidad evidente (Kavanaugh y col. *Arthritis Rheum* 1994; 37:992-9; Haug y col. *Transplantation* 1993; 55: 766-72).

El nuevo hallazgo de que ICAM-1 dirigido puede conducir a la apoptosis demuestra la posibilidad de usar moléculas de unión específicas de ICAM-1, tales como anticuerpos, para el tratamiento de cánceres de diferentes orígenes, siempre que expresen el antígeno.

Basándose en su expresión de ICAM-1, los tipos de cáncer que se pueden tratar con un anticuerpo anti-ICAM-1 inductor de la apoptosis tal como B11 incluyen: linfoma B, mieloma (Huang y col. (1993) *Hybridoma* 12 p661-75; Huang y col., (1995) *Cancer Res* 55 p610-6; Smallshaw y col., (2004) *J Immunother* 27 p419-24), cáncer gástrico (Maruo y col., (2002) *Int J Cancer* 100 p486-90), cáncer de mama (Rosette y col., (2005) *Carcinogenesis* 26 p943-50), cáncer de hígado (Sun y col., (1999) *J Cancer Res Clin Oncol* 125 p28-34), cáncer de pulmón (Grothey y col., (1998) *Br J Cancer* 77 p801-7), melanoma (Wang y col., (2005) *Int J Cancer* 27 p419-24), cáncer de vejiga (Roche y col., (2003) *Thromb Haemost* 89 1089-97) y cáncer de próstata (Aalinkeel y col., (2004) *Cancer Res* 64 p5311-21). La expresión de ICAM-1 también se ha identificado en la metástasis tumoral, como lo demuestran (Maruo y col., 2002), (Rosette y col., 2005), (Sun y col., 1999), (Grothey y col., 1998), (Aalinkeel y col., 2004), lo que apunta a la posibilidad de intervenir en los procesos de metástasis usando un anticuerpo específico de ICAM-1.

En una divulgación adicional, el antígeno de superficie celular es HLA-DR/DP.

HLA-DR/DP normalmente está presente, por ejemplo, en los linfocitos B, y se puede encontrar regulado positivamente en las células del linfoma B.

Hasta la fecha, tres anticuerpos monoclonales específicos de HLA-DR diferentes han entrado en ensayos de fase clínica. La adición más reciente de los mismos es el 1D09C3 de IgG<sub>4</sub> completamente humano, que se aisló de una biblioteca de fagos sin tratamiento previo de tamaño similar en comparación con n-CoDeR®, pero usando la selección en fase sólida en antígeno purificado (Nagy y col. *Nat Med* 2002; 8:801-7).

Se ha identificado un nuevo anticuerpo humano (B1) dirigido contra HLA-DR/DP que rápidamente y con alta potencia induce la apoptosis en una multitud de líneas celulares de linfoma B, demostrando así que HLA-DR/DP está ligado a la inducción de la apoptosis en una célula diana.

El anticuerpo B1 se unió a una multitud de líneas celulares de linfoma B de diferente origen (véase el Ejemplo 1 y la Tabla 1) y demostró inducir la apoptosis en células que expresan el antígeno HLA-DR/DPA. Además, el anticuerpo B1 mostró una mayor potencia que Rituximab al ensayarse en la línea celular de linfoma B Raji. Esto fue particularmente evidente, cuando se usó el formato de IgG<sub>4</sub> del anticuerpo B1 (Figura 8).

De los datos obtenidos, este anticuerpo tiene características adecuadas para el tratamiento de las células de linfoma B que expresan HLA-DR/DP. Además, de manera similar a la dirección de Rituximab hacia la artritis reumatoide y al LES (lupus eritematoso sistémico), el anticuerpo B1 puede resultar eficaz en la eliminación de los linfocitos B activados en trastornos en los que las células de linfoma B, que expresan HLA-DR/DP, son perjudiciales.

En otra divulgación más, el antígeno de superficie celular es IgM de superficie.

IgM, en su forma libre, existe como una gran estructura pentamérica, cuyo peso molecular superior tiende a confinarla dentro de los vasos sanguíneos.

Se puede encontrar IgM monomérica en las paredes celulares de los linfocitos B, y funciona como un receptor de anticuerpo para el reconocimiento del antígeno.

El anticuerpo C11, tras la unión a la IgM de superficie, expresada sobre células de linfoma B, induce la apoptosis de una manera rápida y eficaz (véase el Ejemplo 1 y la Tabla 1). En contraste con los anticuerpos anti-IgM específicos del idiotipo previamente usados en el entorno clínico para el tratamiento del linfoma B, el anticuerpo C11 se une a un epítipo no polimórfico expresado en los linfocitos B de diferentes donantes y es, por tanto, adecuado para el

tratamiento de pacientes que sufren linfoma B independientemente de idiotipo del linfoma B.

En particular, la molécula efectora, por ejemplo, el anticuerpo anti-IgM también podría ser cualquier tipo de molécula de unión específica que cause apoptosis en las células que expresan IgM de diferentes idiotipos.

5 Las cinéticas de la apoptosis inducida por IgG B1, B11 y C11 fueron rápidas, observándose la máxima eficacia ya después de 3 horas en algunas líneas celulares. La función efectora rápida es importante para la eficacia terapéutica, ya que reduce al mínimo el riesgo de la evasión del tumor como resultado de, por ejemplo, la falta de expresión de antígeno tumoral (Uytenhove y col. *J. Exp. Med.* 1983; 157:1040-52; Kennedy y col. *Br J Haematol* 2002; 119:412-6) o la mutación epitópica (Weiner y col. *J Immunol* 1989; 142:343-51; Bai y col. *J. Clin. Invest.* 2003; 111:1487-96), y limita potencialmente la duración del tratamiento y los efectos secundarios (Robert y col. *Lancet Oncol* 2005; 6:491-500.)

15 Preferentemente, la célula diana es una célula inmunitaria o una célula epitelial y, ventajosamente, dicha célula inmunitaria es un linfocito B.

Convenientemente, la célula diana está asociada a una enfermedad. Preferentemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: cáncer; enfermedades autoinmunitarias incluyendo, pero sin limitación, artritis reumatoide y LES, trastornos inflamatorios agudos y crónicos, septicemia y enfermedades infecciosas, incluyendo, pero sin limitación, el VIH.

Ventajosamente, la enfermedad es un cáncer seleccionado entre linfoma (leucemia, mieloma), cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer corioideo, cáncer de páncreas, cáncer de colon y cáncer de próstata.

25 Convenientemente, la molécula de anticuerpo es una IgG. La IgG puede ser cualquiera de entre IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>, pero preferentemente cualquiera de entre IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub>. La molécula de anticuerpo es preferentemente humana.

30 Convenientemente, la molécula de unión o la molécula de anticuerpo de la invención tienen la secuencia de una cualquiera de las secuencias de la región variable de la Figura 10.

En una realización de la divulgación, la molécula de unión o la molécula de anticuerpo tiene las secuencias de la región variable de la Figura 9 o sus homólogos funcionalmente equivalentes.

35 En una realización adicional de la divulgación, la molécula de unión o la molécula de anticuerpo tienen las secuencias de la región variable de la Figura 11 o sus homólogos funcionalmente equivalentes.

Convenientemente, el ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las Figuras 9 a 11.

40 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de la molécula de anticuerpo de la invención en el diagnóstico y/o el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad que requiere la destrucción de una célula diana. También se proporciona el uso de la molécula de anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad que requiere la destrucción de una célula diana.

45 Convenientemente, la enfermedad que se va a tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer; enfermedades autoinmunitarias incluyendo, pero sin limitación, artritis reumatoide y LES, trastornos inflamatorios agudos y crónicos, septicemia y enfermedades infecciosas incluyendo, pero sin limitación, el VIH.

50 Ventajosamente, la enfermedad que se va a tratar es cáncer seleccionado entre linfoma (leucemia, mieloma), cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer corioideo, cáncer de páncreas, cáncer de colon y cáncer de próstata.

55 En una realización de la invención, la molécula de unión o la molécula de anticuerpo se unen específicamente a ICAM-1 y/o tiene la secuencia de la Figura 10 y se usa en relación con las enfermedades enumeradas anteriormente.

60 En una realización adicional de la divulgación, la molécula de anticuerpo se une específicamente a HLA-DR/DP y/o tiene la secuencia de la Figura 9 y se usa en relación con las enfermedades de linfoma (leucemia, mieloma), cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer corioideo, cáncer de páncreas, cáncer de colon y cáncer de próstata.

65 En una realización adicional más de la divulgación, la molécula de anticuerpo se une específicamente a IgM de superficie y/o tiene la secuencia de la Figura 11 y se usa en relación con las enfermedades de linfoma (leucemia, mieloma), cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer corioideo, cáncer de páncreas, cáncer de colon y cáncer de próstata.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de anticuerpo de la invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

### Significado de los términos usados

5 La expresión "molécula de anticuerpo" se entenderá que se refiere a uno cualquiera de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un derivado de anticuerpo. Se pretende englobar a los anticuerpos de tipo silvestre, anticuerpos sintéticos, anticuerpos recombinantes o híbridos de anticuerpo tales como, pero sin limitación, una molécula de anticuerpo modificada monocatenaria producida por presentación en fagos de regiones variables y/o constantes de  
10 cadena ligera y/o pesada de inmunoglobulina, u otras moléculas inmunointeractivas capaces de unirse a un antígeno en un formato de inmunoensayo que es conocido por los expertos en la materia.

15 La expresión "fragmento de anticuerpo" se entenderá que se refiere a uno cualquiera de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un derivado de anticuerpo. Se pretende englobar a los anticuerpos de tipo silvestre (es decir, una molécula que comprenda cuatro cadenas polipeptídicas), anticuerpos sintéticos, anticuerpos recombinantes o híbridos de anticuerpo, tales como, pero sin limitación, una molécula de anticuerpo modificada monocatenaria producida por presentación en fagos de regiones variables y/o constantes de cadena ligera y/o pesada de  
20 inmunoglobulina, u otras moléculas inmunointeractivas capaces de unirse a un antígeno en un formato de inmunoensayo que es conocido por los expertos en la materia.

25 La expresión "derivado de anticuerpo" se entenderá que se refiere a cualquier molécula de anticuerpo modificada que sea capaz de unirse a un antígeno en un formato de inmunoensayo que es conocido por los expertos en la materia, tal como un fragmento de un anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fab o Fv), o una molécula de anticuerpo modificada que se haya modificado mediante la adición de uno o más aminoácidos u otras moléculas para facilitar el acoplamiento de los anticuerpos a otro péptido o polipéptido, a una proteína portadora grande o a un soporte sólido (por ejemplo, los aminoácidos tirosina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína y derivados de los mismos, grupos NH<sub>2</sub>-acetilo o grupos amido con extremo COOH, entre otros).

30 La expresión "molécula de ScFv" se refiere a cualquier molécula en la que los dominios asociados V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> están unidos a través de un oligopéptido flexible.

35 Las expresiones "secuencia de nucleótidos" o "ácido nucleico" o "polinucleótido" u "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a un heteropolímero de nucleótidos o a la secuencia de estos nucleótidos. Estas expresiones también se refieren a ADN o ARN de origen genómico o sintético que pueden ser monocatenarios o bicatenarios y que pueden representar la cadena sentido y antisentido, al ácido nucleico peptídico (PNA) o a cualquier material de tipo ADN o ARN. En las secuencias del presente documento, A es adenina, C es citosina, T es timina, G es guanina y N es A, C, G o T (U). Se contempla que, cuando el polinucleótido es ARN, la T (timina) de las secuencias proporcionadas en el presente documento está sustituida con U (uracilo). En general, los segmentos de  
40 ácido nucleico proporcionados por la presente invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos de los enlazadores del genoma y de oligonucleótidos cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, o de nucleótidos individuales, para proporcionar un ácido nucleico sintético que sea capaz de expresarse en una unidad de transcripción recombinante que comprenda elementos reguladores derivados de un operón microbiano o viral, o un gen eucariota.

45 Los términos "polipéptido" o "péptido" o "secuencia de aminoácidos" se refieren a una secuencia de oligopéptido, de péptido, de polipéptido o de proteína, o fragmento de la misma, y a moléculas de origen natural o sintético. Un "fragmento", "porción" o "segmento" polipeptídico es un tramo de restos de aminoácido de al menos aproximadamente 5 aminoácidos, preferentemente de al menos aproximadamente 7 aminoácidos, más preferentemente de al menos aproximadamente 9 aminoácidos y lo más preferentemente de al menos  
50 aproximadamente 17 o más aminoácidos. Para ser activo, cualquier polipéptido debe tener una longitud suficiente para presentar actividad biológica y/o inmunológica.

55 El término "purificado" o la expresión "sustancialmente purificado", como se usan en el presente documento, denotan que el ácido nucleico o el polipéptido indicado está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas, por ejemplo, polinucleótidos, proteínas y similares. En una realización, el polinucleótido o polipéptido se purifica de forma que constituya al menos el 95 % en peso, más preferentemente al menos el 99 % en peso, de las macromoléculas biológicas indicadas presentes (pero puede haber agua, tampones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tengan un peso molecular inferior a 1.000 daltons).

60 El término "aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico o polipéptido separado de al menos otro componente (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) presente con el ácido nucleico o polipéptido en su fuente natural. En una realización, el ácido nucleico o polipéptido se encuentra en presencia de (si existe) solo a un disolvente, tampón, ión u otro componente normalmente presente en una solución del mismo. Los términos "aislado" y "purificado" no abarcan ácidos nucleicos ni polipéptidos presentes en su fuente natural.

65

El término "recombinante", cuando se usa en el presente documento para referirse a un polipéptido o a una proteína, significa que un polipéptido o proteína deriva de sistemas de expresión recombinante (por ejemplo, microbianos, de insectos o de mamíferos). "Microbianos" se refiere a polipéptidos o proteínas recombinantes fabricados en sistemas de expresión de bacterias u hongos (por ejemplo, levadura). Como producto "microbiano recombinante" se define a un polipéptido o a una proteína que esencialmente está exento de sustancias endógenas nativas y que no viene acompañado de glucosilación nativa asociada. Los polipéptidos o las proteínas expresados en la mayoría de los cultivos bacterianos, por ejemplo, *Escherichia coli*, estarán exentos de modificaciones de glucosilación; y los polipéptidos o proteínas expresados en la levadura tendrán un patrón de glucosilación en general diferente de los expresados en las células de mamíferos.

Las expresiones "unión selectiva" y "selectividad de unión" indican que las regiones variables de los anticuerpos de la invención reconocen y se unen a polipéptidos de la invención exclusivamente (es decir, capaces de distinguir el polipéptido de la invención de otros polipéptidos similares a pesar de la identidad, homología o similitud de secuencia encontrada en la familia de polipéptidos), pero también pueden interactuar con otras proteínas (por ejemplo, anticuerpos de proteína A de *Staphylococcus aureus* u otros anticuerpos en las técnicas de ELISA) mediante interacciones con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos y, en particular, en la región constante de la molécula. Los ensayos de selección para determinar la selectividad de unión de un anticuerpo de la invención son bien conocidos y puestos habitualmente en práctica en la técnica. Para una descripción exhaustiva de dichos ensayos, véase Harlow y col. (Eds), "Antibodies A Laboratory Manual"; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N. Y. (1988), capítulo 6. También se contemplan anticuerpos que reconocen y se unen a fragmentos de los polipéptidos de la invención, siempre que los anticuerpos sean, ante todo, selectivos de, como se ha definido anteriormente, los polipéptidos de longitud completa de la invención. Al igual que con los anticuerpos que son selectivos de los polipéptidos de longitud completa de la invención, los anticuerpos de la invención que reconocen fragmentos son aquellos que pueden distinguir los polipéptidos de la misma familia de polipéptidos a pesar de la identidad, homología o similitud inherente de secuencia encontrada en la familia de proteínas.

La expresión "afinidad de unión" incluye el significado de la fuerza de unión entre una molécula de anticuerpo y un antígeno.

La expresión "célula inmunitaria" pretende significar cualquier célula que esté implicada en una respuesta inmunitaria o inflamatoria del huésped, incluyendo, pero sin limitación, linfocitos B y linfocitos T.

La expresión "célula epitelial" pretende significar una célula del epitelio. El epitelio es un tejido compuesto de una capa de células. El epitelio se puede encontrar revistiendo las superficies libres internas (por ejemplo, el endotelio, que reviste el interior de los vasos sanguíneos) o externas (por ejemplo, la piel) del organismo.

La capa más externa de la piel se compone de células epiteliales escamosas, como lo son las membranas mucosas que revisten el interior de la boca y de las cavidades corporales. Otras células epiteliales revisten el interior de los pulmones, del tracto gastrointestinal, del tracto urinario y del tracto reproductor, y constituyen las glándulas exocrinas y endocrinas. Las funciones de las células epiteliales incluyen secreción, absorción y protección. Las células epiteliales se asientan en una lámina basal.

### **Realizaciones preferidas**

A continuación, se describirán ejemplos que incorporan ciertos aspectos preferidos de la invención con referencia a las siguientes figuras, en las que:

#### **Figura 1 - scFv aislado mediante bioselección diferencial de células enteras/vesículas de membrana celular que muestra una alta especificidad por la célula diana.**

Se expresaron clones de scFv aislados por bioselección diferencial en células TOP 10 de *E. coli* y se incubaron con células Ramos o Jurkat y (A) clones de scFv expresados para la bioselección primaria o (B) setenta y dos clones de scFv escogidos al azar y reexpresados. Se detectó scFv unido con anticuerpo monoclonal anti-His y anticuerpo policlonal anti-Cy5 de ratón. La unión celular se detectó en un instrumento de detección de alto rendimiento macroconfocal FMAT. La unión celular se representa como la intensidad de fluorescencia media hacia células Ramos diana (eje Y) frente a células Jurkat no diana (eje X). (C) Unión de siete clones de scFv únicos a células Ramos (barras rellenas) y células Jurkat (barras sin rellenar). Un scFv de control (ctrl) no se unió a ninguna de las células.

#### **Figura 2. Inducción de la apoptosis de scFv anti-Ramos**

Se incubaron secuencialmente células de linfoma B Ramos con scFv anti-Ramos, anticuerpo monoclonal anti-His y anticuerpo policlonal anti-ratón en hielo (con lavado intermitente para eliminar el exceso de anticuerpo no unido), y se incubaron en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C durante 24 horas. A continuación, se recogieron las células y se sometieron a tinción combinada con Anexina V-AF488 (AV) y yoduro de propidio (PI). Las células se clasificaron como viables (AV- PI-, círculos rellenos, Fig. 2C), apoptóticas tempranas (AV+ PI-, triángulos sin rellenar, Fig. 2C) o apoptóticas tardías/necróticas (AV+ PI-, diamantes sin rellenar Fig. 2C), basándose en la positividad diferencial para la tinción con AV y PI (definida por ventanas de análisis cuadradas

en la Fig. 2B). Los resultados se presentan trazando (A) la difusión frontal (Altura de la difusión frontal) frente a la difusión lateral; y (B) AV (FL-1) frente a PI (FL-3). También se presenta el efecto valorable de scFv B1 y F1 (C). Se incubaron los siete clones de scFv únicos con células de linfoma B (D) Ramos o (E) Raji a 37 °C durante 24 horas a diversas concentraciones, y el efecto sobre la inducción de la apoptosis estudiado. Tres scFv: B1, B11 y C11, muestran actividad valorable hacia las dos líneas celulares, mientras que la capacidad de inducción de la apoptosis de scFv B10, C10 y G12 se limita a células de linfoma B Ramos.

### Figura 3. Las especificidades de los anticuerpos aislados incluyen HLA-DR/DP, IgM e ICAM-1

**A)** Se lisaron  $50-600 \times 10^6$  células de linfoma B Raji con el detergente no iónico Triton X-100 al 0,5 % v/v y se inmunoprecipitaron con 100 µg del formato de IgG1 totalmente humano del anticuerpo B1 (carril 1) y anticuerpo B11 (carril 2), seguido de la reticulación con proteína A Sefarosa. Los lisados de células de linfoma B Ramos, de  $50 \times 10^6$  células, se usaron para la precipitación de 20 µg de C11 (carril 3). Se escindieron las bandas específicas de los anticuerpos, y se sometieron a digestión triptica y se analizaron por MALDI-TOF.

**B)** La unión de IgG B1, IgG B11 e IgG C11 a células de linfoma B se bloquea específicamente mediante la preincubación con anticuerpos anti-HLA-DR/DP, anti-ICAM-1 o anti-IgM, respectivamente.

Para confirmar las identidades de los antígenos de MALDI-TOF recuperados de los clones de anticuerpos B1, B11 y C11, se llevaron a cabo estudios de bloqueo con anticuerpos disponibles en el mercado y se analizaron por citometría de flujo. Las células se bloquearon previamente con un exceso molar de 10 veces (en comparación con el anticuerpo humano) de los anticuerpos de bloqueo adaptados a la especie durante 1 h, seguido de la adición de cualquiera de los clones de anticuerpos humanos aislados. Después de 30 min, se lavaron las células y se detectó la unión del anticuerpo humano a las células con IgG anti-humana de cabra conjugada con PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Los anticuerpos de bloqueo usados en el estudio fueron para B1: monoclonales de ratón anti-HLA DR (Sigma, clon HK14) o anti-CD40 (Becton Dickinson, clon 5C3); para B11: policlonales de conejo anti-ICAM-1 (Abeam, ab7815-250) o anti-CD22 (Abeam, ab25135-100); para C11, policlonales de cabra anti-IgM (Zymed, South San Francisco, CA, EE.UU., 62-7500) o anti-IgG (Zymed, 62-8400).

### Figura 4. ICAM-1 es un receptor de superficie celular asociado al linfoma B capaz de mediar la muerte celular programada

A. Se añadieron 2 µg/ml de IgG<sub>1</sub> B11 o anti-FITC-8 (control) a  $4 \times 10^5$  células de linfoma B CL-01, se incubaron durante 2 h en hielo, tras lo que se añadieron 10 µg/ml de anticuerpo Fc anti-humano de cabra Fab'2 secundario reticulante. Se incubaron las células a 37 °C durante 6 h, y se determinó el efecto de la incubación del anticuerpo mediante dos ensayos de apoptosis independientes. Se tiñeron las células bien con AV/PI (panel superior), de manera similar a la descrita anteriormente, o por incubación con 5 µg/ml del reactivo de despolarización de la membrana mitocondrial JC-1 durante 30 min a temperatura ambiente (panel inferior). La inducción de la apoptosis es detectable por una disminución de la proporción de la intensidad de fluorescencia del rojo (eje y) con respecto al verde (eje x). (B) Sección histológica que muestra la unión representativa del anticuerpo B11 al tejido de linfoma B. Se tiñó tejido liofilizado obtenido de un paciente con linfoma de linfocitos B de gran tamaño anaplásico con anticuerpo scFv B11 o FITC-8 (control). La unión del anticuerpo se detectó con DAB (color marrón). La imagen insertada muestra la tinción con scFv de control. (C) Se mezclaron células Ramos previamente marcadas con anticuerpo monoclonal CD45-PerCp-Cy5.5 con PBMC derivadas del donante, y se tiñeron las diferentes poblaciones de células con anticuerpos específicos de CD conjugados con fluorocromo e IgG<sub>1</sub> B11 previamente marcada con Alexa Flour 647 Zenon o IgG<sub>1</sub> FITC-8 de control. La unión de IgG B11 a las diferentes poblaciones de células se registró en el canal FL4.

### Figura 5. Afinidades de IgG B1 e IgG B11 a las células de linfoma B

Se incubaron células Raji (paneles de la izquierda, IgG B1) o células Ramos (paneles de la derecha, IgG B11) con cantidades crecientes de proteína IgG B1 radioyodada o proteína IgG B11 radioyodada en presencia o ausencia de 0,2 mg/ml de la correspondiente proteína IgG sin marcar. Se determinó la unión específica restando la unión en presencia de la proteína competitiva sin marcar de la unión total. La cantidad de proteína IgG B1 o IgG B11 unida aumentó con cantidades crecientes de proteína IgG libre, alcanzándose la unión saturable a IgG B1 ~30 nM e IgG B11 ~1 nM, respectivamente (paneles superiores). El análisis del gráfico de Rosenthal-Scatchard (paneles inferiores) demostró una constante de disociación de ~3 nM con 400.000 sitios funcionales de unión por célula Raji para IgG B1, y una constante de disociación de ~0,3 nM con 47.400 sitios de unión funcionales para IgG B11 (células Raji).

**Figura 6 - Unión de IgG<sub>1</sub> B1, B11 y C11 a líneas celulares tumorales de diferente origen.** Se examinó la distribución de los antígenos dirigidos por los anticuerpos B1, B11 y C11 en diferentes líneas celulares de carcinoma por citometría de flujo. Los histogramas muestran la unión del anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab (picos de la primera fila más delantera), IgG<sub>1</sub> B1 (picos de la segunda fila), IgG<sub>1</sub> B11 (picos de la tercera fila) o IgG<sub>1</sub> C11 (picos de la cuarta fila más trasera) a células de carcinoma de mama MCF-7, de carcinoma de páncreas HPAC, de carcinoma de próstata de PC-3, de carcinoma colorrectal LS174T y de leucemia monocítica THP-1, como se indica.



**Figura 7 - Inducción de la apoptosis de IgG<sub>1</sub> B11 en células de carcinoma**

Se cultivó la línea celular de carcinoma de próstata PC-3 en medio completo de crecimiento (RPMI 1640, suplementado con FCS al 10 %, HEPES 10 mM y L-glutamina 2 mM) hasta una confluencia del 80 % en una placa de 6 pocillos. La línea celular de carcinoma de próstata DU145 se cultivó en MEM con sales de Earl, suplementadas con FCS al 10 %, piruvato sódico 1 mM y aminoácidos no esenciales 1 mM, y el derivado de una línea celular de melanoma MDA MB 435 se cultivó en DMEM suplementado con FCS al 10 %. Para los ensayos de apoptosis, se lavaron las células en PBS, y se añadió IgG<sub>1</sub> B11 (o IgG<sub>1</sub> B1, Trastuzumab o control de anticuerpo negativo para los controles) diluido en serie a pocillos individuales, permitiéndose la unión durante una incubación de 1-2 h a 4 °C. Las células se lavaron y se añadió medio completo de crecimiento, que contenía anticuerpo de reticulación, Fab '2 de cabra anti-humano a 10 µg/ml. Se incubaron las células en una atmósfera humidificada, con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C, durante 16-24 horas. Se recogieron las células por tripsinización y se tificaron con Alexa Fluor 488-Anexina V (AF488-AV) y yoduro de propidio (PI), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante la fórmula: % de células apoptóticas = 100 - % de AF488 - AV/PI -/-.

A) Representación gráfica que muestra la distribución relativa de las células PC-3 en función de la positividad en Anexina V y yoduro de propidio tras la incubación como se ha explicado anteriormente con 2 µg/ml de IgG B11 o IgG B1.

B) Gráfico de barras que muestra el porcentaje medio de células PC-3 apoptóticas tras la incubación con IgG<sub>1</sub> B11 diluido en serie o 20 µg/ml de IgG<sub>1</sub> B1.

C) Gráfico de barras que muestra el porcentaje medio de células MDA MB 435 apoptóticas tras la incubación con control sin anticuerpo, 10 µg/ml de control de anticuerpo negativo, IgG<sub>1</sub> B11 diluido en serie o 10 µg/ml de IgG<sub>1</sub> Trastuzumb.

D) Gráfico de barras que muestra el porcentaje medio de células DU145 apoptóticas tras la incubación con control sin anticuerpo, 10 µg/ml de control de anticuerpo negativo, IgG<sub>1</sub> B11 diluido en serie o 10 µg/ml de IgG<sub>1</sub> Trastuzumb.

**Figura 8. IgG<sub>1</sub> B1 e IgG<sub>4</sub> B1 inducen la citotoxicidad celular directa sobre células de linfoma B Raji en ausencia de reactivos de reticulación**

Se incubaron células Raji con IgG<sub>1</sub> B1, IgG<sub>4</sub> B1, IgG<sub>1</sub> Rituximab o IgG<sub>1</sub> CT-17 de control a 20; 6,7 o 2,2 µg/ml durante 24 horas. Se recogieron las células y se determinó la viabilidad como el porcentaje de células doblemente negativas en Anexina V y yoduro de propidio.

**Figura 9 - Secuencias de VH y VL (de nucleótidos y aminoácidos) para el anticuerpo B1****Figura 10 - Secuencias de VH y VL (de nucleótidos y aminoácidos) para el anticuerpo B11****Figura 11 - Secuencias de VH y VL (de nucleótidos y aminoácidos) para el anticuerpo C11****Ejemplo 1 - Selección y detección (bioselección) para anticuerpos inductores de la apoptosis con especificidad por los receptores de superficie celular asociados al linfoma B****Cultivo de células**

Las líneas celulares usadas en el presente estudio se obtuvieron de ATCC-(Manassas, VA, EE.UU.) o Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH (Braunschweig, Alemania), y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10 %, L-Glutamina 2 mM, HEPES 10 mM y piruvato de Na 1 mM (todo de Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) a menos que se indique lo contrario. La línea de células de leucemia T Jurkat (clon E6-1, TIB-152, ATCC), las líneas de células de linfoma B DOHH-2 (ACC47, DSMZ), SC-1 (ACC558, DSMZ), WSU-NHL (ACC58, DSMZ), JVM-2 (ACC12, DSMZ), Jeko-1 (ACC553, DSMZ cultivada en FCS al 20 %), Rec-1 (ACC 584, DSMZ), Sup-53 (Daibata y col. *Cancer* 1989; 64:1248-53), RL (CRL-2261, ATCC), Granta 519 (DSMZ), NCEB-1 (Saltman y col., *Blood* 1988; 72:2026-30), BJAB (Menezes y col. *Biomedicine* 1975; 22:276-84), Ramos (RL-1596, ATCC), Raji (CCL-86, ATCC), Daudi (CCL-213, ATCC), CL-01 (Cerutti y col. *J Immunol* 1998;160: 2145-57), KM-3/Reh de linfoma de linfocitos pre-B (CRL-S286, ATCC) y MC/CAR de mieloma múltiple (CRL-8083, ATCC, cultivada en IMDM (Invitrogen) suplementada en FCS al 20 %) estaban todas exentas de micoplasma y se cultivaron en una atmósfera humidificada a 37 °C, usando una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se mantuvieron a 2 x 10<sup>5</sup>-1 x 10<sup>6</sup> células/ml.

**Preparación de vesículas de membrana celular Jurkat**

Se recogieron las células Jurkat por centrifugación a 300 x g durante 15 min en cubos de 500 ml (Corning Inc. Life Science, Nueva York, EE.UU.), se lavaron en PBS de Dulbecco (Invitrogen), y se volvieron a suspender en tampón A (NaHCO<sub>3</sub> 1 mM, MgAc 1,5 mM, pH 7,4). La concentración de células era de aproximadamente 5 x 10<sup>7</sup> células

Jurkat/ml ( $5 \times 10^9$  células en 100 ml de Tampón A).

Se realizó la alteración celular mediante un tratamiento de choque hipo-osmótico (tampón A) en hielo durante 10-30 min y la posterior cavitación con nitrógeno en una bomba de cavitación con nitrógeno (Parr Instrument Company, Moline, IL, EE.UU.). Las células se mantuvieron a una presión constante de 4000 kPa (40 bar) durante 15 min a 0 °C.

Se recogieron células alteradas en un tubo Sarstedt de 250 ml (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemania) que contenía 500 µl de EDTA 0,5 M para dar una concentración final EDTA de 2,5 mM. La adición de EDTA evita la agregación de vesículas de la membrana. El homogeneizado (100 ml) se dividió entre 4 tubos de rotor de pared gruesa Beckman de 25 ml (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.), que se centrifugaron durante 10 min a 1.900 xg (4.000 rpm en un rotor Sorvall SS34) a 4 °C para eliminar las células intactas, los núcleos y las mitocondrias pesadas.

Se recogió el sobrenadante y se volvió a suspender el material sedimentado en 25 ml de tampón de  $\text{NaHCO}_3$  1 mM que contenía EDTA 1 mM y se volvió a centrifugar (recuperación adicional de membranas de Jurkat en bruto sedimentadas). Se combinaron las membranas de Jurkat con las membranas de la primera centrifugación. Se ultracentrifugaron los sobrenadantes que contenían vesículas de membrana de Jurkat en bruto usando un rotor Beckman de Tipo 45Ti a 40.000 rpm (aprox. 200.000 x g) durante 2,5 horas a 4 °C. Se separaron los sobrenadantes por vertido y se retiró el tampón restante inclinando el borde del tubo contra un tejido (por ejemplo, Kleenex<sup>TM</sup>).

Se transfirió el sedimento de membrana en bruto a un homogeneizador Dounce con ayuda de una barra de metal y se volvió a suspender en 2,5 ml de tampón de HES (Hepes 10 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 0,25 M, pH 7,4) mediante varios golpes suaves en el homogeneizador. De este modo, se obtuvo una concentración de suspensión de membrana equivalente de  $2 \times 10^9$  células/ml que contenía de 80 a 100 mg de proteína.

*Selección de anticuerpos de fago mediante bioselección competitiva de células enteras/vesículas de membrana celular*

Se precalentaron aproximadamente  $2 \times 10^{13}$  partículas de fago a 37 °C durante 15 min con mezclado intermitente, se centrifugaron durante 15 min a 14.000 x g para retirar los precipitados, y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf. Se añadió leche desnatada en polvo hasta una concentración final del 2 % (p/v). Se descongelaron sobre hielo preparados de vesículas de membrana de Jurkat derivadas de  $2 \times 10^9$  células (selección de la serie 1; selecciones de la serie 2 y 3,  $2 \times 10^8$  células), y se mezclaron con las partículas de fago bloqueadas. La mezcla se incubó durante 15 min en hielo.

Se recogieron  $5 \times 10^7$  ( $5 \times 10^6$  en la 2ª y 3ª serie) células Ramos por centrifugación a 1.200 rpm durante 6 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se volvieron a suspender las células Ramos en la mezcla de vesícula de membrana de Jurkat, fago y leche. Se incubó la suspensión a 10 °C bajo rotación lenta de extremo a extremo durante 4 h.

Se transfirió la mezcla de células/membrana de células/fago a un tubo Falcon de 15 ml (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.), que contenía 0,5 ml de Ficoll-Paque PLUS al 100 % (teñido con azul de tripano) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en la parte inferior y 9,5 ml de Ficoll al 40 % (v/v) encima en BSA/PBS al 2 % (p/v) (Ficoll-pilar). Se centrifugó el tubo a 1.500 rpm durante 10 min a 4 °C. Se retiró el tubo del centrifugador y se enroscó la tapa del tubo y se selló herméticamente.

Se cortó el "extremo" del fondo del tubo Falcon que contenía Ficoll al 100 % usando un cortapuros. Por lo tanto, se retiró del tubo el material de muy alta densidad que incluía láminas de vesículas de membrana y núcleos celulares. A continuación, se retiró el tapón del tubo cuidadosamente, interrumpiendo el vacío del interior del tubo y permitiendo la expulsión del líquido gota a gota a través de la abertura de la parte inferior del tubo (corte).

Se lavó la suspensión celular recogida una vez en PBS para retirar el exceso de Ficoll. Se volvió a suspender el sedimento en 1 ml de PBS (no realizado tras el último lavado) y se volvió a cargar la suspensión en la parte superior de un nuevo Ficoll-pilar, repitiéndose el procedimiento de lavado (dos veces en las series 2 y 3).

Se eluyeron los fagos de las células mediante la adición de 150 µl de ácido cítrico 76 mM (pH 2,5) en PBS seguido de la incubación a temperatura ambiente durante 5 min. Se neutralizó la mezcla mediante la adición de 200 µl de Tris-HCl 1 M, pH 7,4. Se reservaron los sobrenadantes que contenían el fago eluido tras la granulación de las células a 300 x g durante 5 min. La elución adicional de los fagos fue mediante la resuspensión e incubación del sedimento celular en 1 ml de tripsina a temperatura ambiente durante 10 min.

Tras la inactivación con 40 µl de aprotinina a 1 mg/ml, se centrifugaron las células y se reservó el sobrenadante que contenía los fagos eluidos. Para infectar HB101F' de *Escherichia coli* se usaron los fagos eluidos y se sembraron las bacterias en un medio TB que contenía antibióticos apropiados y glucosa. Se contaron las colonias de bacterias, se rasparon de las placas y se usaron como inóculos para la siguiente serie de selección.

*Conversión al formato de scFv, expresión de scFv, purificación y análisis de la unión celular*

Se digirió la combinación de fagémidos obtenida tras las tres series de selección con *EagI* para retirar el gen III. Se volvió a ligar el vector resultante. Se linealizaron los vectores que contenían fragmentos de gen III sin cortar religados mediante la digestión con la enzima *EcoRI*. La combinación de vectores de scFv así generada se usó para transformar células TOP10 de *E. coli* esencialmente como se describe anteriormente (Soderlind y col., *Nat Biotechnol* 2000; 18: 852-6).

Se sembraron las bacterias en grandes placas de agar de 500 cm<sup>2</sup> y se recogieron los clones individuales, se transfirieron a placas de 96 pocillos, y se expresaron en medio TB mediante el cultivo de una noche a 37 °C, y 220 rpm usando un sistema automatizado (Hallborn Biotechniques 2002; Supl: 30-7). Se produjeron fragmentos de scFv recombinantes en medio TB que contenía los antibióticos apropiados.

Para la detección primaria del clon de scFv de unión a células Ramos diana y células Jurkat no diana, se incubaron 5.000 células Ramos o Jurkat con cualquiera de los 960 clones de scFv, derivados de la tercera serie de selección y producidos como se ha descrito anteriormente. Las células se incubaron con 0,5 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-6xHis (R & D Systems, Minneapolis, EE.UU.) y 0,7 µg/ml de reactivo anti-ratón de cabra conjugado con Cy5 (Amersham Biosciences). Se analizó la unión celular en un instrumento de detección de alto rendimiento macroconfocal de fluorescencia (FMAT) de sistema de detección celular δ200 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Tras la detección primaria, se escogieron setenta y dos clones bacterianos al azar (es decir, independientemente de la reactividad de las células diana frente a la reactividad de las células no diana en la detección primaria) para la secuenciación del ADN como se ha descrito previamente (Soderlind y col. *Nat Biotechnol* 2000,18: 852-6) (Soderlind y col., 2000). Para evaluar la unión a la superficie celular por citometría de flujo, se incubaron células Ramos y Jurkat (ambas añadidas a 2 x 10<sup>5</sup> células por ensayo) con clones de scFv individuales a una concentración de 2-10 µg/ml en PBS (Invitrogen) que contenía BSA al 0,5 % p/v (DPBS-B) durante 1 h.

Se lavaron las células por centrifugación a 300 x g durante 6 min. Se incubaron las células con anticuerpo monoclonal CD19 conjugado con FITC y anticuerpo monoclonal CD3 conjugado con PE (BD), permitiendo la posterior identificación de las células diana y no diana, respectivamente. La detección de la unión de scFv se logró mediante la incubación con RPE-Cy5-estreptavidina (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) después de la incubación con anticuerpo monoclonal anti-6xHis biotinilado. Se incubaron las células con reactivos secundarios y terciarios durante 40 min y 15 min respectivamente. Todas las incubaciones se realizaron sobre hielo usando soluciones enfriadas con hielo.

*Selección de células enteras/vesículas de membrana celular*

En el presente estudio, se utilizó un nuevo protocolo de selección para aislar anticuerpos dirigidos a antígenos expresados diferencialmente en su configuración nativa de la superficie celular. Después de tres series de bioselección competitiva, usando células de linfoma B Ramos enteras y vesículas de membrana derivadas de células de leucemia T Jurkat, se aislaron scFv de fagos recombinantes. Estos se convirtieron en scFv solubles y se expresaron en células TOP10 de *E. coli*.

Se incubaron los scFv recombinantes con células enteras diana (Ramos) o no diana (Jurkat), y se examinaron para determinar la unión celular. La especificidad hacia los antígenos de las células diana de los clones de anticuerpos fue sorprendente, ya que 482 clones de scFv expresados resultaron unirse selectivamente a células diana Ramos a intensidades que variaron de débil a muy fuerte (Fig. 1A). Solo se identificaron dos clones que tiñeron débilmente las células Jurkat no diana (Fig.1A).

A continuación, se determinó la diversidad genotípica de los scFv presentados en fagos aislados. Se escogieron setenta y dos clones de scFv al azar (es decir, independientemente del tropismo de unión según lo determinado en la detección primaria) para la secuenciación del ADN.

Se volvieron a expresar simultáneamente los clones y se volvió a evaluar la especificidad por las células diana (Ramos frente a Jurkat) mediante la tecnología FMAT, como se ha descrito (Fig. 1B). Se identificaron siete genotipos diferentes de anticuerpos, determinados por sus diferentes secuencias de CDRH3 y CDRL3 (datos no mostrados).

La alta especificidad de los scFv anti-Ramos se confirmó mediante tres análisis de citometría de flujo en color, después de la incubación con el mismo número de células Ramos y Jurkat y la detección de la unión de scFv por medio de anticuerpo anti-marcador (Fig. 1C).

Las células diana y no diana se definieron mediante la expresión de CD19 y CD3, respectivamente, usando anticuerpos monoclonales específicos de CD conjugado con fluorocromo. Los siete clones de scFv únicos genotípicamente mostraron intensidades de unión altas y variables con las células diana Ramos, pero no mostraron unión con las células Jurkat no diana, en comparación con el scFv de control negativo.

*Ensayo de apoptosis*

Se redujeron los niveles de lipopolisacáridos de fragmentos scFv producidos de forma recombinante usando columnas de Detoxigel de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE.UU.). Los niveles de endotoxina restantes se cuantificaron mediante el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (Cambrex Bioscience, Walkersville, MD, EE.UU.).

Se encontró que todas las muestras de scFv contenían menos de 0,1 UI/ml de lipopolisacárido. El anticuerpo quimérico anti-CD20 MabThera™ (Rituximab) se adquirió en el Hospital Universitario de Lund (Lund, Suecia). Se incubaron  $2 \times 10^5$  células de linfoma B (Raji o Ramos) o células T Jurkat con diluciones en serie y scFv desintoxicados en medio de cultivo durante 1 h en hielo.

Se incubaron las células secuencialmente con anticuerpo monoclonal anti-6xHis secundario (5 µg/ml) y anticuerpo Fab'2 anti-ratón de cabra terciario (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EE.UU.). Los lavados intermitentes garantizaron la eliminación del reactivo de anticuerpo no unido en exceso. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h.

Cuando se usaron IgG enteras para la inducción de la apoptosis, el reactivo de reticulación se reemplazó por anticuerpo Fcγ anti-humano Fab'2 de cabra (Jackson ImmunoResearch) con una reactividad cruzada mínima con isotipos de anticuerpos distintos de IgG (para evitar la reticulación inespecífica de inmunoglobulinas de superficie asociadas al linfoma B endógeno) y se incubaron, como se ha descrito anteriormente, durante 6 h.

A menos que se indique lo contrario, las células apoptóticas se detectaron mediante la tinción combinada con anexina V Alexa Fluor 488 (AV) y yoduro de propidio (PI) (ambos de Molecular Probes, Invitrogen), y posteriores análisis por citometría de flujo. Las células se definieron como viables (AV-/PI-), apoptóticas tempranas (AV+/PI-) o apoptóticas tardías/necróticas (AV+/PI+). Las señales de AV y PI se registraron en los canales FL1 y FL2 o FL3 (como se indica en el texto), respectivamente, usando un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences).

Para investigar la funcionalidad del scFv aislado, se configuró un ensayo de detección de la apoptosis de alto rendimiento, basado en la incubación secuencial y el lavado de las células con scFv y reactivo de reticulación. La dependencia en el clon de scFv y la concentración en el ensayo de apoptosis se demuestran en las Fig. 2A-C, en las que se compara el efecto apoptótico del clon de scFv B1 seleccionado con el efecto del clon de scFv F1 que no muestra inducción de la apoptosis. Las células Jurkat que carecen de expresión del antígeno diana no murieron por la apoptosis tras el tratamiento con ninguno de los scFv examinados, lo que demuestra que la inducción de la apoptosis dependía de la unión al antígeno diana (datos no mostrados).

Usando el ensayo de apoptosis de scFv establecido, se seleccionaron clones para la apoptosis en células de linfoma B Ramos y Raji. Se compararon los efectos apoptóticos inducidos por scFv con los inducidos por anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab (Fig. 2D). Se identificaron tres clones de scFv - B1, B11 y C11 - que indujeron una apoptosis significativa tanto en las células Ramos como Raji (Fig. 2D y E). La inducción de la apoptosis por scFv en las células Raji se correlacionó con la unión a estas células (Fig. 2D), ya que los clones de scFv que no pudieron unirse a las células Raji no indujeron la apoptosis.

Se transfirieron los clones B1, B11 y C11 a anticuerpos IgG1 completamente humanos. Tanto su especificidad como su funcionalidad permanecieron intactas después de formatear, según lo demuestra su fuerte unión y potente citotoxicidad hacia una amplia selección de líneas celulares de linfoma B (Tabla 1). En particular, la inducción de la apoptosis fue rápida, ya alcanzándose el porcentaje máximo de células apoptóticas positivas en anexina V después de tres a seis horas en varias líneas celulares (Tabla 1 y los datos no mostrados).

*Ensayos de producción de IgG y rastreo de endotoxinas*

Se convirtieron fragmentos de anticuerpos scFv en un formato de IgG1λ humana de longitud completa a través de la clonación en un vector pCDNA3 modificado (Norderhaug y col., *J Immunol Methods* 1997; 204:77-87), y se transfectaron transitoriamente a células HEK293 usando reactivo Lipofectamine 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

Se purificó IgG humana de medio de cultivo gastado en una columna de proteína A MabSelect (Amersham Biosciences). La pureza de los preparados fue superior al 98 %, determinada por análisis de SDS-PAGE. Se rastrearon los preparados de anticuerpos y se encontró que contenían < 0,1 UI/ml de endotoxina a las concentraciones usadas en el presente estudio, y según lo determinado por el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (Cambrex Bioscience).

**Ejemplo 2 -Análisis de la especificidad de los anticuerpos***Identificación de antígenos*

- Se determinó la identidad de los antígenos dirigidos mediante inmunoprecipitación de lisados celulares de linfoma B. Se recogieron células ( $50-600 \times 10^6$  por ml de tampón de lisis, en función del anticuerpo y de la línea celular) por centrifugación, se lavaron dos veces en PBS y se incubaron durante 15 min en tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, y cóctel inhibidor de proteasa exento de EDTA completo (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)) que contenía el detergente Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al 0,5 % v/v.
- Se centrifugaron los restos celulares a  $16.000 \times g$  durante 15 min en un centrifugador de mesa convencional y se aclararon previamente las proteínas solubles con un flujo rápido de Proteína A Sefarosa 4 (Amersham Biosciences) (1/10 de volumen de reacción) durante 1 h en rotación. Para cada muestra, se inmunoprecipitó 1 ml de lisado celular previamente aclarado durante 2 h por 20-100  $\mu g$  de cualquiera de los anticuerpos humanos. Se volvió a añadir flujo rápido de proteína A Sefarosa 4 y se incubó durante 30 min, tras lo que se lavaron bien los complejos inmunológicos en tampón de lisis, se hirvieron durante 5 min y, finalmente, se volvieron a suspender en tampón de muestra (1 x tampón de muestra NuPAGE LDS, 1 x agente reductor de muestra NuPAGE) y se separaron en un gel de Bis-Tris al 4-12 % NuPAGE Novex (todos de Invitrogen).
- Después de la tinción (Simply Blue Safestain, Invitrogen), se escindieron las bandas de proteínas de interés del SDS-PAGE y se sometieron a digestión triptica, como se describe (Edvardsson y col., *Electrophoresis* 1999; 20:935-42).
- En resumen, se destiñeron los tapones de gel y se equilibraron lavando tres veces con 200  $\mu l$  de acetonitrilo al 50 % (ACN) con agitación. Tras secar en un concentrador SpeedVac (Savant, Farmingdale, NY, EE.UU.) durante 15 min, se redujeron las muestras mediante la adición de 25  $\mu l$  de DTT 100 mM/ $NH_4HCO_3$  100 mM, y se incubaron a 56 °C durante 1 h y se sometieron a alquilación mediante la adición de 25  $\mu l$  de yodoacetamida 55 mM/ $NH_4HCO_3$  100 mM seguida de la incubación durante 45 min a temperatura ambiente.
- Tras dos etapas de lavado más de 10 min en  $NH_4HCO_3$  100 mM, seguidas de un lavado en ACN al 50 % v/v, se secaron los trozos de gel en un concentrador SpeedVac, y se volvieron a hinchar y se digirieron en 15  $\mu l$  de tripsina a 15 ng/ $\mu l$  (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) en  $NH_4HCO_3$  25 mM a 37 °C durante la noche. Se extrajeron los péptidos mediante la adición de ACN al 50 % v/v/TFA al 1 % v/v y la incubación de 10 min a temperatura ambiente. Se aplicó puntualmente 1  $\mu l$  del extracto en placas de muestra de MALDI y se dejó secar. Se aplicó puntualmente 1  $\mu l$  de solución de matriz (5 mg/ml de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) en ACN al 75 % v/v/TFA al 1 % v/v) encima de los péptidos.
- Se determinaron las masas de los péptidos usando una estación de trabajo 4700 Maldi de Applied Biosystems. Las proteínas se identificaron mediante la búsqueda de bases de datos de identificación genética de masas de péptidos usando herramientas de búsqueda Mascot (Matrixscience, RU). Las especificidades antigénicas de los clones B10, C10 y G12 se identificaron usando una metodología similar, a excepción de que se usaron microperlas magnéticas recubiertas anti-His y de scFv (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) para las inmunoprecipitaciones.
- Tras la conversión al formato de anticuerpo entero, se usaron IgG B1, B11 y C11 para precipitar antígenos de células de linfoma B Raji y Ramos. IgG B1 precipitó dos bandas de aproximadamente 28 y 34 kDa, respectivamente (Fig. 3A, carril 1). Se prepararon cortes de gel que contenían estas bandas, y se digirieron con tripsina y se analizaron por espectrometría de masas, identificando HLADR/DP como el antígeno diana.
- La especificidad de IgG B1 hacia HLA-DR/DP se verificó tanto por transferencia Western como por detección de la proteína HLA-DR/DP, usando un anticuerpo monoclonal disponible en el mercado, y mediante el bloqueo de la unión de IgG B1 tras la incubación previa de las células con un anticuerpo monoclonal específico de HLA-DR disponible en el mercado (Fig. 3B).
- Las identidades de los antígenos IgG B11 y C11 definidos se establecieron usando una metodología similar. IgG C11 resultó precipitar una banda de proteína de 68 kDa identificada como la forma unida a la membrana de la cadena  $\mu$  del receptor de linfocitos B (Fig. 3A, carril 3). IgG B11 precipitó una banda de proteína de 90 kDa que se identificó como la molécula-1 de adhesión celular intercelular (ICAM-1) (Fig. 3A, carril 2). Las especificidades de IgG B11 hacia ICAM-1 y de IgG C11 hacia IgM se confirmaron por análisis de MS-MS, estudios de bloqueo de anticuerpos (Fig. 3B) y análisis de transferencia Western (datos no mostrados), usando anticuerpos disponibles en el mercado.
- Se determinaron las especificidades de los clones B10, C10 y G12, usando microperlas magnéticas recubiertas anti-His y scFv para la inmunoprecipitación. Los tres clones de scFv precipitaron una banda de proteína de 68 kDa, y el análisis de MS de cortes de gel digeridos con tripsina que contenían estas bandas reveló su especificidad hacia la IgM de superficie. Presumiblemente, estos anticuerpos reconocen el idiotipo IgM de Ramos, ya que ninguno de ellos reacciona de manera cruzada con los linfocitos B de la sangre periférica ni con otras líneas de linfocitos B positivas en IgM.

65

**Ejemplo 3 - Análisis de las afinidades de los anticuerpos**

*Yodación in vitro de inmunoglobulinas B1 y B11*

5 Se realizó la yodación de 1 mg/ml de proteínas IgG<sub>1</sub> B1 o IgG<sub>1</sub> B11 con NaI marcado con <sup>125</sup>I en PBS durante 10 min usando tubos de yodación previamente recubiertos con Yodogen (Pierce). Se retiró el NaI marcado con <sup>125</sup>I libre mediante desalación en columnas PD-10 (Amersham Biosciences), produciendo radiactividades específicas en el intervalo de 1.000-1.600 cpm por ng de proteína. Para la determinación de las afinidades de los anticuerpos, se usaron IgG<sub>1</sub> B1 marcada con <sup>125</sup>I e IgG<sub>1</sub> B11 marcada con <sup>125</sup>I.

10

*Determinación de las constantes de afinidad de IgG B1 o IgG B11*

15 Se incubaron IgG B1 o IgG B11 radioyodados con células de linfoma B en DPBS-B-hlgG (DPBS-B que contenía 0,2 mg/ml de IgG humana) durante 2 h en hielo con mezcla intermitente. Se determinó la unión inespecífica en presencia de 0,2 mg/ml de proteína IgG B1 o IgG B11 sin marcar, según el caso. El análisis se realizó por triplicado.

20 Se cargaron las células encima de cojines de Ficoll/DPBS-B al 40 % v/v en tubos individuales y se centrifugaron a 400 x g durante 6 min a 4 °C. Las muestras se congelaron a -80 °C. Se aislaron los sedimentos celulares y los sobrenadantes celulares, y se analizaron por separado para determinar el contenido de proteína IgG marcada con <sup>125</sup>I en un contador gamma, después de cortar los tubos por la mitad.

25 Se determinaron las constantes de afinidad de los anticuerpos (valores de Kd) y los números de epítopos por célula a partir del análisis del gráfico de Scatchard de acuerdo con Rosenthal y col. (*Anal Biochem* 1967; 20:525-32), Bylund y Yamamura ("Methods in Neurotransmitter Analysed". Nueva York: Raven Press Ltd., 1990) y Marquardt (*J. Soc. Indust. Appl. Math* 1963; 11:431-41), según lo descrito previamente (Brix y col. *J. Clin. Invest.* 1998; 102:283-93).

30 Se caracterizó la unión de IgG B1 e IgG B11 a HLA-DR e ICAM-1 mediante la incubación de las proteínas radioyodadas con células Raji o Ramos en presencia o ausencia de 0,2 mg/ml de la proteína IgG sin marcar correspondiente a 4 °C. La unión específica de IgG marcada con <sup>125</sup>I a la superficie celular se calculó restando la unión inespecífica (la unión en presencia de IgG sin marcar en exceso) de la unión total.

35 La saturación de la unión de IgG B1 específica a células Raji se alcanzó a IgG B1 ~30 nM (Fig. 5). El análisis del gráfico de Rosenthal-Scatchard reveló una constante de disociación de ~3 nM con 400.000 sitios de unión funcionales por célula Raji, suponiendo una interacción entre IgG y epítopo bivalente (Fig. 5). Del mismo modo, la constante de disociación de IgG B11 se determinó a ~0,2 nM con 47.400 receptores por célula Ramos.

**Tabla 1. Los anticuerpos IgG B1, B11 y C11 completamente humanos muestran patrones de unión dinámica e inducen la apoptosis en diversas líneas celulares de linfoma B**

Clasificación del tumor	Línea celular	Clon de anticuerpo - especificidad						C11 - IgM		Rituximab-CD20	
		IMF <sup>b</sup>	B1 - HLA DR/DP	B11 - ICAM-1	Inducción de la apoptosis	IMF	Inducción de la apoptosis	IMF	Inducción de la apoptosis	IMF	Inducción de la apoptosis
Linfoma folicular	DOHH-2	140	-	-	-	90	-	480	++		
	WSU-NHL	280	+	-	-	60	-	790	+		
	SC-1	170	+	-	-	50	-	50	-		
	RL	50	-	-	-	210	-	200	+		
Linfoma de células del manto	Granta 519	370	++	+	+	60	+	360	+++		
	JVM-2	650	+	-	-	10	-	520	+		
	Rec-1	0	-	-	-	900	-	580	+		
	SP-53	500	++	-	-	90	-	740	++		
	NCEB-1	750	+	+	+	340	+	430	+		
	Jeko-1	1000	+++	+	+	30	+	1040	++		
Linfoma de Burkitt	Ramos	125	+	++	++	100	++	240	+++		
	Raji	550	+++	+	+	420	+	20	+		
	Daudi	200	+	+	+	150	+	450	+		
	BJAB	530	+	+	+	310	+	510	+		
	CL-01	940	+++	++	++	600	++	60	+		
	Reh/KM-3	240	+++	-	-	20	-	0	-		
Mieloma múltiple	MC/CAR	290	++	+	+	120	+	0	-		

<sup>a</sup>Inducción de la apoptosis; determinada por el porcentaje de células viables tras 6 horas de incubación con cualquiera de los anticuerpos humanos, reticulados con anticuerpo específico Fc de cabra anti-humano (gamma); -, Viabilidad no afectada; +, 95-80 %; ++, 79-60 %; +++, 59-40 % de células viables en comparación con el control (IgG<sub>1</sub> FITC-8 humana). Los resultados se basan en muestras por duplicado en tres experimentos independientes.

<sup>b</sup>IMF; Intensidad Media de Fluorescencia de anticuerpo IgG de cabra anti-humano conjugado con RPE secundario. El valor de IMF dependiente de la línea celular del anticuerpo IgG FITC-8 humano de control se restó de la IMF de cada anticuerpo humano.

**Ejemplo 4 - ICAM-1 es un antígeno asociado al linfoma B con propiedades inductoras de la apoptosis***Análisis de citometría de flujo de la unión de IgG a células Ramos*

5 Se tiñeron células Ramos ( $13 \times 10^6$ ) con anticuerpo monoclonal CD45-PerCp-Cy5.5 mediante la incubación en hielo durante 45 min, se lavaron en DPBS-B y se mantuvieron en hielo hasta la mezcla con PBL purificadas sin marcar.

10 Se obtuvieron capas leucocíticas de dos voluntarios sanos del Hospital Universitario de Lund. Se diluyeron las capas leucocíticas a 1:2 en PBS y se lavaron mediante la centrifugación a 500 x g (centrifugadora Spinchron de Beckman a 1.500 rpm) durante 10 min, la aspiración completa del sobrenadante y la resuspensión en DPBS que contenía FCS al 1 % inactivado por calor (DPBS-HI). El lavado se repitió dos veces. Se lisaron los glóbulos rojos mediante la incubación con solución de lisis de glóbulos rojos (BD Biosciences) durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células por centrifugación a 60 x g (centrifugadora Spinchron de Beckman a 667 rpm) durante 10 min y se aspiró el sobrenadante cuidadosamente. Se contaron las células en una cámara Bürker tras la tinción con reactivo azul de tripano (Invitrogen) y la exclusión de las células muertas, se lavaron en DPBS-HI, se sedimentaron y se volvieron a suspender en DPBS-B que contenía 200 µg/ml de IgG humana purificada (bloqueo de los receptores de Fc).

20 Para cada donante y condición del ensayo, se mezclaron aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  leucocitos con  $1,6 \times 10^5$  células Ramos previamente marcadas con PerCpCy5.5. Se añadieron los anticuerpos monoclonales CD3-FITC, CD56-PE y CD19-PerCpCy5.5 de ratón (BD Biosciences), y las mezclas se incubaron en hielo hasta la adición de IgG humana sin marcar. El marcaje de los anticuerpos IgG humanos n-CoDeR y el anticuerpo quimérico anti-CD20 de ratón-ser humano Rituximab de control positivo con fragmentos Fab AF647 (Molecular Probes, Invitrogen) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 En resumen, se incubaron 4 µg de cada uno de los anticuerpos IgG B1, B11, C11, y Rituximab con 20 µl de reactivo de marcaje AF647-Fab durante 5 min a temperatura ambiente. Tras la adición de 20 µl de reactivo de bloqueo de IgG humana y una incubación adicional durante 5 minutos, se diluyó en tres series la IgG marcada con AF647 en DBP-B, y se añadieron las proteínas IgG diluidas a las soluciones de células Ramos/PBL mixtas.

30 Las muestras se incubaron durante 1 h, se lavaron, se volvieron a suspender en DPBS-B y se analizaron para determinar la unión a diferentes subpoblaciones de células por citometría de flujo, después de la calibración y la compensación apropiadas del instrumento para el análisis a cuatro colores. Las células Ramos se identificaron como la población rica en PerCpCy5.5 distinta de la población pobre en PerCpCy5.5 de linfocitos B.

*Inmunohistoquímica*

40 Se obtuvieron biopsias liofilizadas de los ganglios linfáticos de pacientes con linfoma B anaplásico de células grandes (un paciente), linfoma B no Hodgkin centroblástico/centrocítico (tres pacientes) y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (un paciente) del Departamento de Patología de la Universidad de Lund (Lund, Suecia). Se fijaron secciones de ocho micrómetros de tejido liofilizado en acetona durante 10 minutos a 4 °C. Se bloqueó la actividad de unión a la biotina endógena mediante el tratamiento secuencial con avidina y biotina (kit de bloqueo de avidina/biotina, Invitrogen) durante 20 min cada vez.

45 Los tejidos se incubaron con 5 µg/ml de scFv de control o scFv B11 durante 1 h. Después del lavado, se incubaron las secciones con anticuerpo monoclonal anti-His de ratón conjugado con biotina (R&D Systems) durante 30 min. La unión de scFv se detectó tras el tratamiento con reactivo ABC Complejo/HRP (Dako Cytomation) durante 30 min, y la posterior incubación con DAB durante 5 min.

50 Las secciones se fotografiaron usando una cámara digital Leica DC 300F montada sobre un microscopio óptico/de fluorescencia Leica DMR.

La manipulación de los tejidos humanos se realizó siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética local del Hospital de la Universidad de Lund.

*Ensayo de despolarización de la membrana mitocondrial*

60 La despolarización de la membrana mitocondrial se analizó como se ha descrito previamente (Kim y col., *Mol Biol Cell* 2004; 15: 420-34). En resumen, se mezclaron las células tratadas con anticuerpo con el reactivo JC-1 (Molecular Probes) a 5 µg/ml y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo y se volvieron a suspender en 300 µl de PBS, y se analizaron en un FACS Aria (BD Biosciences). Se recogió la fluorescencia verde y roja a través de filtros de paso de banda de 494/518 nm (FL-1) y 595/615 nm (FL-2), respectivamente.

65 ICAM-1 es una glicoproteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Marlin y col., *Cell* 1987; 51:813-9), que es capaz de inducir la señalización bidireccional (Rothlein y col., *J Immunol* 1994; 152:2488-95; Vyth-Dreese y col.,



*Blood* 1995; 85:2802-12). No se ha demostrado previamente que ICAM-1 participe en la muerte programada en células de linfoma B.

5 Por lo tanto, se ha querido confirmar que la muerte celular inducida por IgG B11 fue un proceso activo, por medios distintos de la translocación de la fosfatidilserina de la membrana celular.

10 Se escogió la despolarización de la membrana mitocondrial como una validación de la apoptosis, ya que se trata de una característica común de la apoptosis dependiente de la caspasa y de la apoptosis independiente de la caspasa, que se puede controlar mediante la tinción de células con yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolil-carbocianina (reactivo JC-1).

15 De acuerdo con el presente ensayo de anexina V/yoduro de propidio (Fig. 4A, panel superior), se encontró que IgG B11 induce la despolarización de la membrana mitocondrial en células de linfoma B CL-01, según lo determinado mediante el análisis de citometría de flujo tras la tinción con reactivo JC-1 (Fig. 4A, panel inferior).

Para excluir la posibilidad de que la expresión de ICAM-1 sea un artefacto *in vitro*, consecuencia de una regulación positiva general durante el cultivo celular, se examinó la unión de IgG B11 al tejido obtenido de cinco pacientes diferentes con diferentes tumores de linfoma B.

20 Mediante inmunohistoquímica, la IgG B11 mostró una fuerte unión a los cinco tejidos de linfoma (Fig. 4B), a intensidades comparables, o ligeramente inferiores, a las del anticuerpo IgG B1 anti-HLA-DR/DP (Tabla 2).

25 A continuación, se examinó la unión de IgG B11 al linfoma B frente a los leucocitos de sangre periférica en reposo. Se escogieron las células Ramos como línea celular de linfoma B representativa, basándose en su baja expresión epitópica terminal, a pesar de su sensibilidad significativa a la apoptosis inducida por B11. El análisis de citometría de flujo, después de la incubación mixta de células Ramos previamente marcadas con leucocitos de sangre periférica entera y anticuerpos bien IgG B1, B11 o C11, reveló que la IgG B11 mostró una fuerte unión a las células Ramos.

30 Y, lo que es más importante, B11 demostró la mayor unión diferencial (mayor regulación positiva de los antígenos) de los tres anticuerpos a las células de linfoma B Ramos frente a los leucocitos de sangre periférica normal (Fig. 4C. y los datos no se muestran). La unión de IgG B11 ya alcanzó un máximo a 0,1 µg/ml y fue regulada positivamente 3,7 veces más en Ramos que en los monocitos (IMF de 654 frente a 176), regulada positivamente 8,3 veces más en Ramos que en los linfocitos B de sangre periférica (IMF de 654 frente a 78) y regulada positivamente 23 veces más que en los linfocitos NK. La unión a otros subconjuntos de leucocitos de sangre periférica monitorizados fue negativa.

**Tabla 2. ICAM-1 se expresa fuertemente en tejido de linfoma B de diferente origen**

ID del paciente	Clasificación del tumor	Clon de anticuerpo - especificidad	
		B11-ICAM-1	B1-HLA-DR/DP
A	B-CLL <sup>c</sup> (Linfoma no Hodgkin de baja malignidad)	+	++
B	Linfoma anaplásico de linfocitos B de células grandes	++	+++
C	Linfoma B no Hodgkin centroblástico/centrocítico	++/+++	++
D	B-CLL/B-PLL <sup>d</sup>	++	+++
E	Linfoma B no Hodgkin centroblástico	++/+++	+++
F	Linfoma B no Hodgkin centroblástico/centrocítico	++	+++

<sup>c</sup>B-CLL = Leucemia linfocítica crónica B, <sup>d</sup>B-PLL = Leucemia linfocítica Pro-B. Los números crecientes de + indican una mayor tinción.

40 **Ejemplo 5 - Distribución de los antígenos de IgG<sub>1</sub> B1, B11 y C11 en líneas celulares tumorales de diversos orígenes, según lo determinado por citometría de flujo.**

45 Se examinó la distribución antigénica de antígenos dirigidos a anticuerpos humanos, principalmente a B11, en diferentes líneas celulares de carcinoma. Se lavaron las células (carcinoma de mama MCF-7 y MDA MB 435S, carcinoma corioideo JAR y JEG-3, carcinoma de pulmón A549, carcinoma de vejiga urinaria TCC-SUP, melanoma MDA MB 435, HPAC, carcinoma de páncreas PANC-1 y BxPC-3, carcinoma de próstata PC-3 y DU145, LS174T, CaCo<sub>2</sub> y carcinoma colorrectal Lovo, y células de leucemia monocítica THP-1) en PBS y se volvieron a suspender a 4 x 10<sup>5</sup> células/ml en medio completo (200.000 células/50 µl de muestra). Se diluyeron en de 3 a 10 series anticuerpos IgG<sub>1</sub> B1, IgG<sub>1</sub> B11, IgG<sub>1</sub> C11, IgG<sub>1</sub> FITC-8 de control negativo y anticuerpo monoclonal anti-CD20

5 Rituximab (10-0,1 pg/ml) en medio completo (50 µl/muestra). Se incubaron las células con cualquiera de los anticuerpos durante 1 hora en hielo, se lavaron por resuspensión en PBS/BSA al 0,5 %, se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos, y se realizó la aspiración completa de los sobrenadantes. Se incubaron las células con IgG anti-humano F(ab')<sub>2</sub> de cabra conjugado con PE (Caltag Laboratories, n.º de catálogo: H10104), y se diluyeron 1/50 en PBS/BSA al 0,5 %, durante 30 minutos, en hielo. Después de la resuspensión en 300 µl PBS/BSA al 0,5 %, se analizaron las células para determinar la unión de IgG usando un instrumento FACScan.

10 Las células de carcinoma de próstata PC-3 mostraron una fuerte expresión de ICAM-1 como lo demuestra la fuerte unión de IgG B11 a estas células (Fig. 6). Las células de carcinoma de mama MCF-7, de carcinoma de páncreas HPAC y de carcinoma colorrectal LS174T también resultaron expresar ICAM-1, aunque a menor intensidad en comparación con las células de cáncer de próstata. Por el contrario, las células de leucemia monocítica THP-1 no expresaron ICAM-1. Todas las líneas celulares de carcinoma ensayadas dieron negativo en la expresión de CD20, HLA-DR/DP e IgM como se demuestra por la falta de unión de IgG Rituximab, IgG B1 e IgG C11, respectivamente. Otros estudios sobre líneas de células de carcinoma adicionales indicaron que todas las células de carcinoma  
15 examinadas dieron positivo en la expresión de ICAM-1 (Tabla 3).

**Tabla 3. ICAM-1 se expresa con fuerza en líneas celulares de carcinoma de diferente origen**

Tipo de célula tumoral	Línea celular	IMF
Carcinoma corioideo	JAR	2000
	JEG-3	1600
Carcinoma de próstata	DU145	2200
	PC-3	1500
Carcinoma de páncreas	BxPC-3	2000
	PANC-1	3800
Carcinoma de colon	CaCo2	800
	Lovo	1600
Carcinoma de pulmón	A549	800
Carcinoma de vejiga urinaria	TCC-SUP	3200
Melanoma	MDA MB 435	4000
Carcinoma de mama	MDA MB 435S	800

**Ejemplo 6 - Inducción de la apoptosis de IgG<sub>1</sub> B11 en células de carcinoma**

20 En el Ejemplo 5, se mostró que IgG<sub>1</sub> B11 se une con fuerza a las células de carcinoma. El presente ejemplo examinó las propiedades de inducción de la apoptosis de este anticuerpo en células de carcinoma.

25 Se sembraron células en placas de 6 pocillos con medio de crecimiento completo tres días antes de iniciarse el experimento. Las células tenían una confluencia del 50 al 75 % en el momento del experimento. Se lavaron las células con PBS enfriado con hielo y se incubaron con IgG<sub>1</sub> B11 diluido en serie (20-0,02 µg/ml como se indica en las figuras, en 1 ml de medio completo de crecimiento), IgG<sub>1</sub> B1 de control a 20 µg/ml, IgG<sub>1</sub> de control negativo a 10 µg/ml o IgG<sub>1</sub> Trastuzumab a 10 µg/ml como se indica a 4 °C durante 1-2 horas. Se lavaron las células con PBS enfriado con hielo y se añadió anticuerpo F(ab'<sub>2</sub>) secundario de cabra anti-humano (diluido en medio completo de crecimiento a 10 µg/ml). Se incubaron las células a 37 °C, en una atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 16-24 horas. Se recogieron las células totales, aislando primero el sobrenadante, seguido del lavado con PBS y la tripsinización del resto de células adherentes. La reacción enzimática se terminó mediante la resuspensión en PBS que contenía suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 %. Se lavaron las células en PBS enfriado con hielo, se sometieron a tinción con anexina V/yoduro de propidio, y se analizaron para determinar la viabilidad/apoptosis como se describe en el Ejemplo 5 anterior.  
35

40 IgG<sub>1</sub> B11 demostró inducir la apoptosis en las líneas celulares de carcinoma de una manera específica y titulable (Figura 7). IgG<sub>1</sub> B1 de control, que no se unió a las células PC-3 (véase el Ejemplo 5), tampoco indujo la apoptosis en las células PC-3. IgG<sub>1</sub> de control negativo o IgG<sub>1</sub> Trastuzumab no fueron capaces de inducir la apoptosis en las células DU145 ni MDA MB435.

**Ejemplo 7 - Formulaciones farmacéuticas y administración**

5 Un aspecto adicional de la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la invención en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

Preferentemente, la formulación es una dosis unitaria que contiene una dosis o unidad diaria, subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

10 Los compuestos de la invención normalmente se administrarán por vía oral o por cualquier vía parenteral, en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de una sal de adición de base o de ácido orgánica o inorgánica no tóxica, en una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y del paciente que se vayan a tratar, así como de la vía de administración, las composiciones se pueden administrar a dosis variables.

15 En terapia humana, los compuestos de la invención se pueden administrar solos, pero generalmente se administrarán en mezcla con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la vía pretendida de administración y a la práctica farmacéutica convencional.

20 Por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Los compuestos de la invención también se pueden administrar a través de inyección intracavernosa.

25 Dichos comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina; disgregantes tales como almidón (preferentemente, almidón de maíz, almidón de patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos; y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

30 También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para las suspensiones acuosas y/o los elixires, los compuestos de la invención se pueden combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

35 Los compuestos de la invención también se pueden administrar parenteralmente, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben estar adecuadamente tamponadas (preferentemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se realiza fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia.

40 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en un estado criodesecado (liofilizado) que solo requiera la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, de agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

45 Para la administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosis diario de los compuestos de la invención normalmente será de 1 mg/kg a 30 mg/kg. Así pues, por ejemplo, los comprimidos o las cápsulas del compuesto de la invención pueden contener una dosis de compuesto activo para una sola administración, o dos o más a la vez, según sea apropiado. En cualquier caso, el médico será quien determine la dosis real, que será la más adecuada para cualquier paciente individual, y que variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente en particular. Las dosis anteriores son ilustrativas del caso medio. Como es evidente, puede haber casos individuales en los que se requieran intervalos de dosis superiores o inferiores, y están dentro del alcance de la presente invención.

60 Los compuestos de la invención también se pueden administrar por vía intranasal o por inhalación, y se suministran convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de pulverización de aerosol desde un

5 recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoro-etano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una  
10 válvula para suministrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, la bomba, el pulverizador o el nebulizador pueden contener una solución o suspensión del compuesto activo, por ejemplo, usando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, que puede contener además un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitán. Las cápsulas y los cartuchos (fabricados, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo de un compuesto de la invención y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

15 Las formulaciones en aerosol o polvo seco se disponen preferentemente de modo que cada dosis medida o "descarga" proporcione una dosis apropiada de un compuesto de la invención para administrarla al paciente. Se apreciará que la dosis diaria total con un aerosol variará de un paciente a otro, pudiéndose administrar en una sola dosis o, más habitualmente, en dosis divididas durante todo el día.

20 Como alternativa, los compuestos de la invención se pueden administrar en forma de un supositorio o pesario, o se pueden aplicar tópicamente en forma de una loción, una solución, una crema o un polvo de uso externo. Los compuestos de la invención también se pueden administrar por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche para la piel. También se pueden administrar por vía ocular, particularmente, para el tratamiento de enfermedades oculares.

25 Para el uso oftálmico, los compuestos de la invención se pueden formular en forma de suspensiones micronizadas en solución salina estéril, a pH ajustado, isotónica, o, preferentemente, en forma de soluciones en solución salina estéril, a pH ajustado, isotónica, opcionalmente, en combinación con un conservante tal como un cloruro de benzalconio. Como alternativa, se pueden formular en una pomada tal como vaselina.

30 Para la aplicación tópica en la piel, los compuestos de la invención se pueden formular en forma de una pomada adecuada que contenga el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno y polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, se pueden formular en forma de una loción o de una crema adecuada, suspendida o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

35 Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen grageas que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

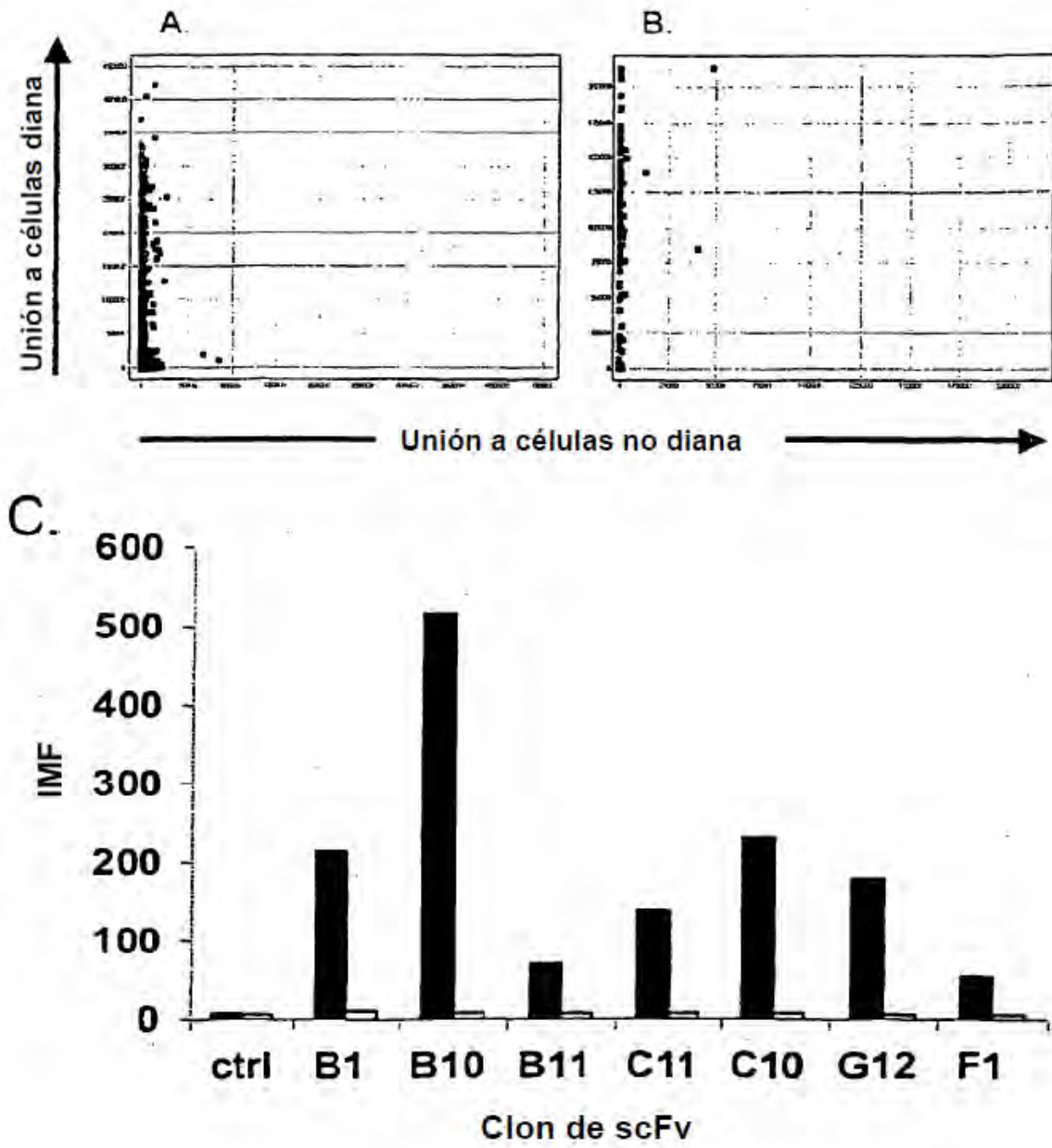
40 En general, en los seres humanos, la administración oral o tópica de los compuestos de la invención es la vía preferida, siendo la más conveniente. En los casos en los que el receptor sufre un trastorno de deglución o de deterioro de la absorción de los fármacos tras la administración oral, el fármaco se puede administrar parenteralmente, por ejemplo, sublingual o bucalmente.

45 Para el uso veterinario, se administra un compuesto de la invención en forma de una formulación convenientemente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal, y será el cirujano veterinario quien determine la pauta posológica y la vía de administración más apropiadas para un animal en particular.

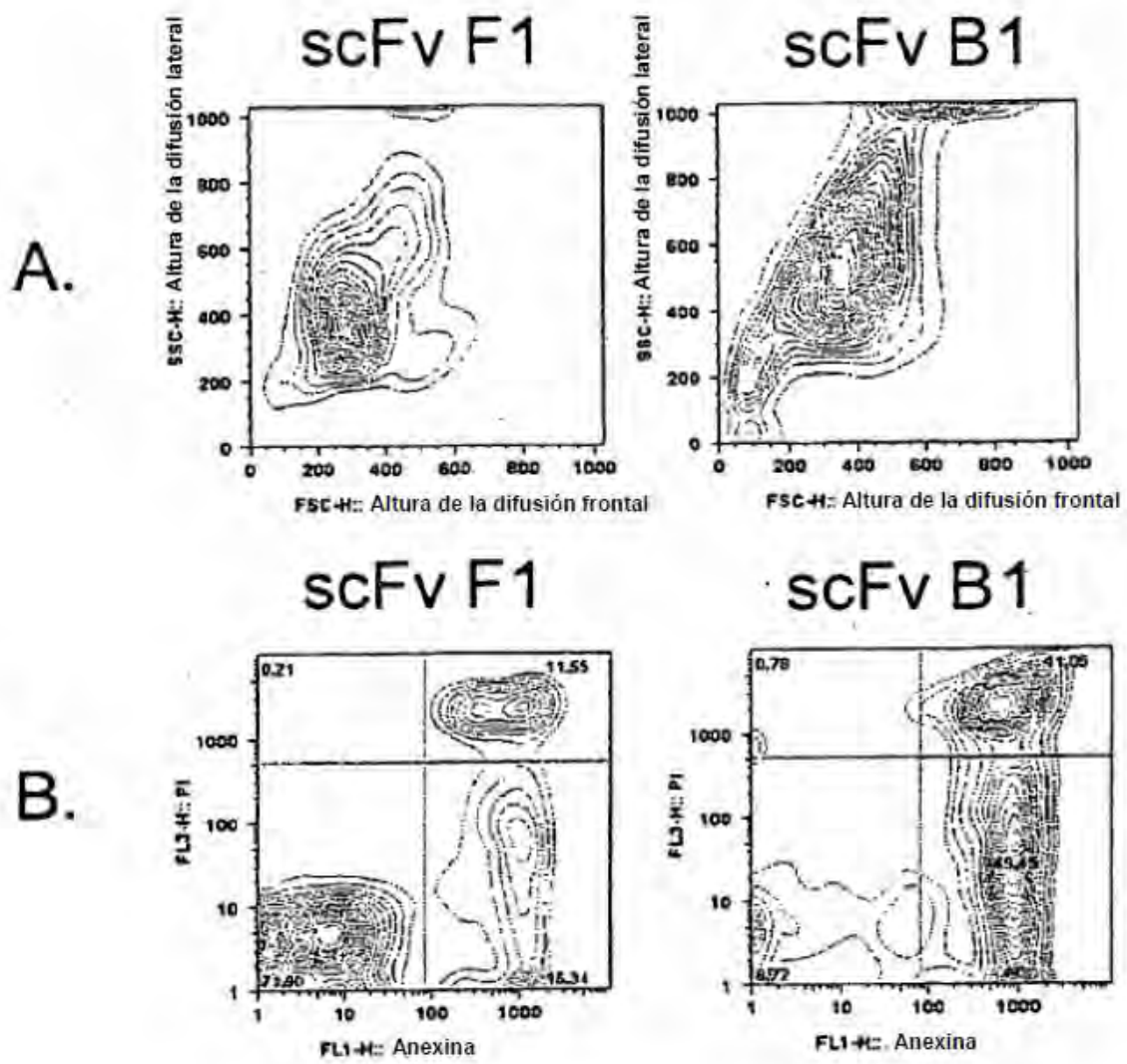
**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* de inducción de la apoptosis en una célula diana que comprende las etapas de:
  - 5 a. proporcionar una o más células diana que presenten el antígeno de superficie celular ICAM-1;
  - b. proporcionar una o más moléculas de unión que se unan selectivamente a ICAM-1 de superficie celular y que, al unirse a ICAM-1, induzcan apoptosis de la célula diana;
  - c. exponer las células diana de (a) a las moléculas de unión de (b) para inducir apoptosis en las células diana;
- 10 en el que las moléculas de unión son moléculas de anticuerpo humanas, teniendo dichas moléculas de anticuerpo regiones variables que tienen las secuencias de la Figura 10.
2. Una molécula de unión que se une selectivamente a ICAM-1 de superficie celular y que, al unirse a ICAM-1, induce la apoptosis de una célula diana, en donde la molécula de unión es una molécula de anticuerpo humana,
  - 15 teniendo dicha molécula de anticuerpo regiones variables que tienen las secuencias de la Figura 10.
3. Una molécula de unión según lo reivindicado en la reivindicación 2 para su uso en el método de la reivindicación 1.
- 20 4. Una molécula de unión según lo reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde la célula diana es una célula inmunitaria o una célula epitelial.
5. Una molécula de unión según lo reivindicado en la reivindicación 4, en donde la célula inmunitaria es un linfocito B.
- 25 6. Una molécula de unión según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la célula diana está asociada a una enfermedad.
7. Una molécula de unión según lo reivindicado en la reivindicación 6, en donde la enfermedad se selecciona del
  - 30 grupo que consiste en: cáncer, enfermedades autoinmunitarias, incluyendo, pero sin limitación, artritis reumatoide y LES, trastornos inflamatorios agudos y crónicos, septicemia y enfermedades infecciosas, incluyendo, pero sin limitación, el VIH.
8. Una molécula de unión según lo reivindicado en la reivindicación 7, en donde la enfermedad es un cáncer
  - 35 seleccionado entre linfoma (leucemia, mieloma), cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer coroideo, cáncer de páncreas, cáncer de colon y cáncer de próstata.
9. La molécula de unión según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde la molécula de anticuerpo es una IgG.
- 40 10. La molécula de unión según lo reivindicado en la reivindicación 9, en donde la IgG se selecciona del grupo que consiste en una IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>.
11. Un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo según lo
  - 45 reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.
12. Un ácido nucleico según lo reivindicado en la reivindicación 11 que tiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 10.
- 50 13. Una molécula de unión según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 para su uso en el diagnóstico y/o el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, requiriendo el diagnóstico y/o el tratamiento y/o la prevención la destrucción de una célula diana.
14. Uso de la molécula de unión según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 en la fabricación
  - 55 de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, requiriendo el diagnóstico y/o el tratamiento y/o la prevención la destrucción de una célula diana.
15. La molécula de unión para el uso de acuerdo con la reivindicación 13 o el uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la enfermedad que se va a tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer, enfermedades
  - 60 autoinmunitarias incluyendo, pero sin limitación, artritis reumatoide y LES, trastornos inflamatorios agudos y crónicos, septicemia y enfermedades infecciosas, incluyendo, pero sin limitación, el VIH.
16. La molécula de unión para su uso o uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la enfermedad que se va a tratar es cáncer seleccionado entre linfoma (leucemia, mieloma), cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de
  - 65 hígado, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer coroideo, cáncer de páncreas, cáncer de colon y cáncer de próstata.

17. La molécula de unión para su uso o uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde la molécula de unión o la molécula de anticuerpo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, y la enfermedad que se va a tratar es un linfoma según lo definido en la reivindicación 16.
- 5 18. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 y un vehículo, un excipiente o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 10 19. Una molécula de unión, molécula de unión para el uso, ácido nucleico, uso o composición farmacéutica según lo definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, en donde la molécula de unión se une selectivamente a ICAM-1 de superficie celular y, al unirse a ICAM-1 induce la apoptosis de una célula diana *in vitro*.



**Figura 1**



**Figura 2**



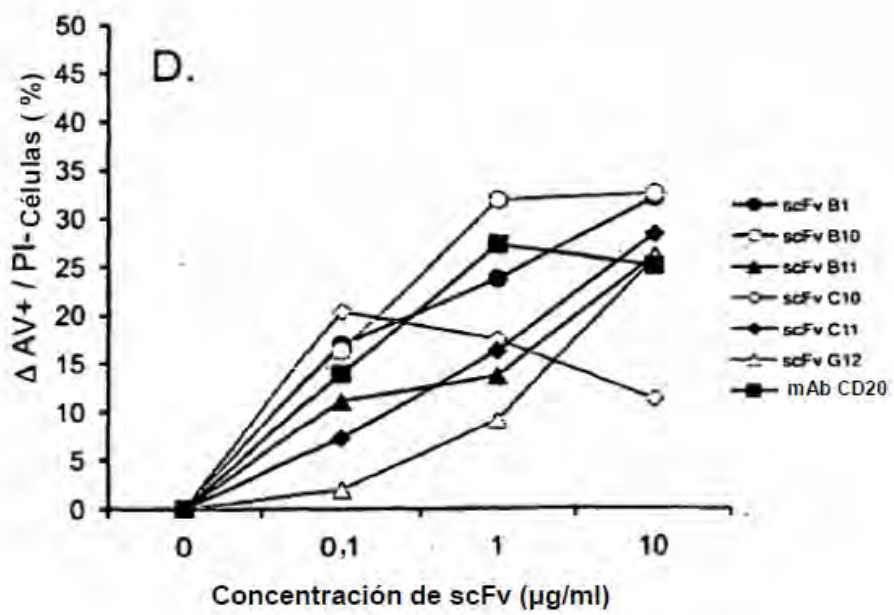
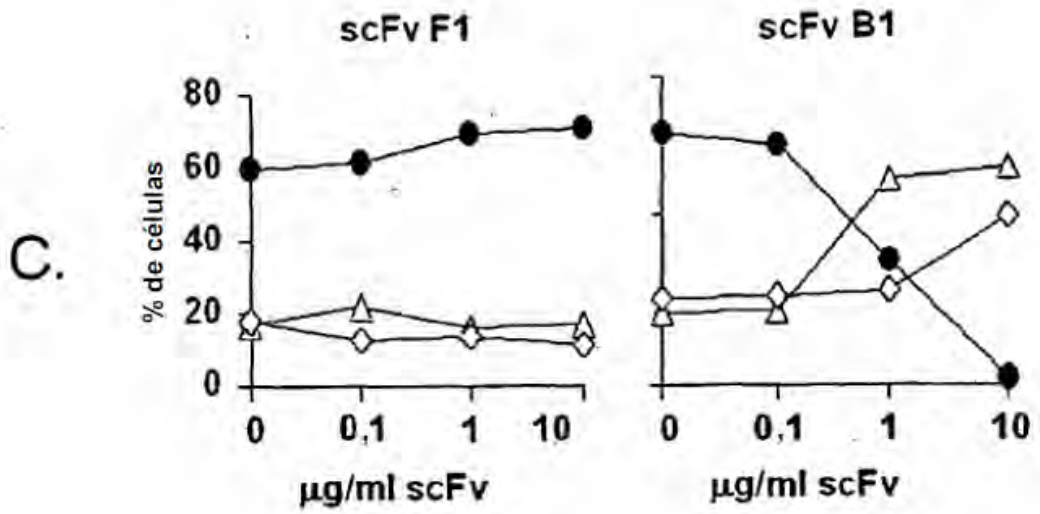
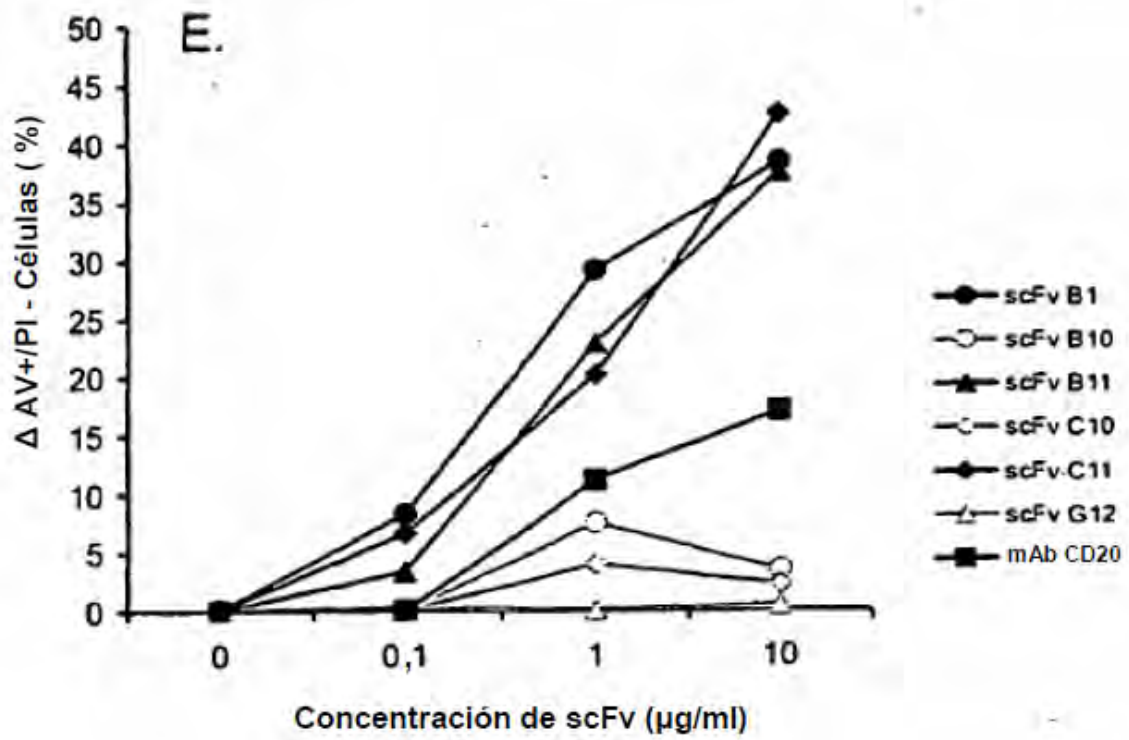
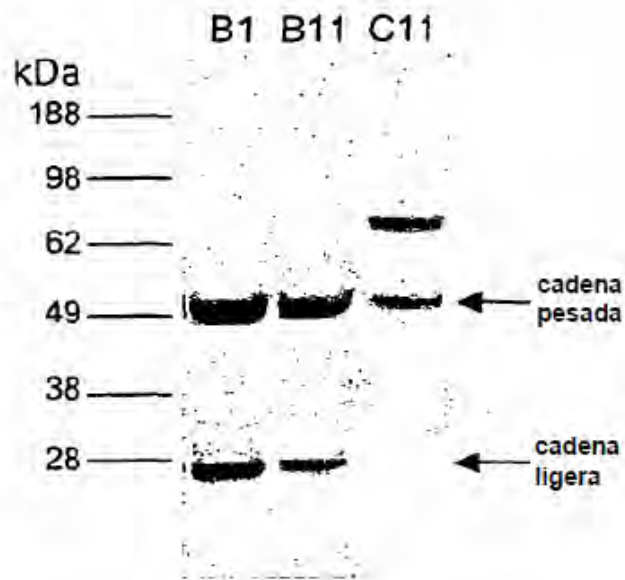


Figura 2 (continuación)

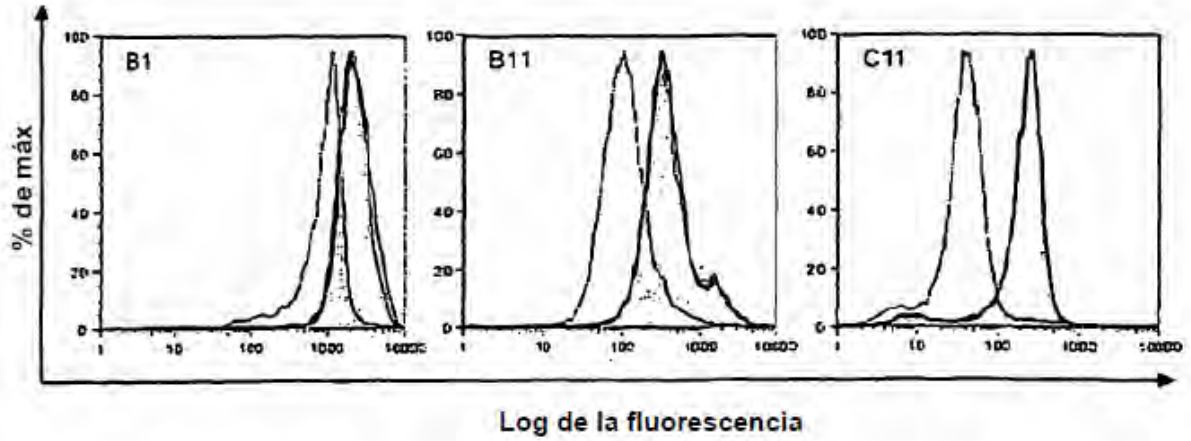


**Figura 2 (continuación)**

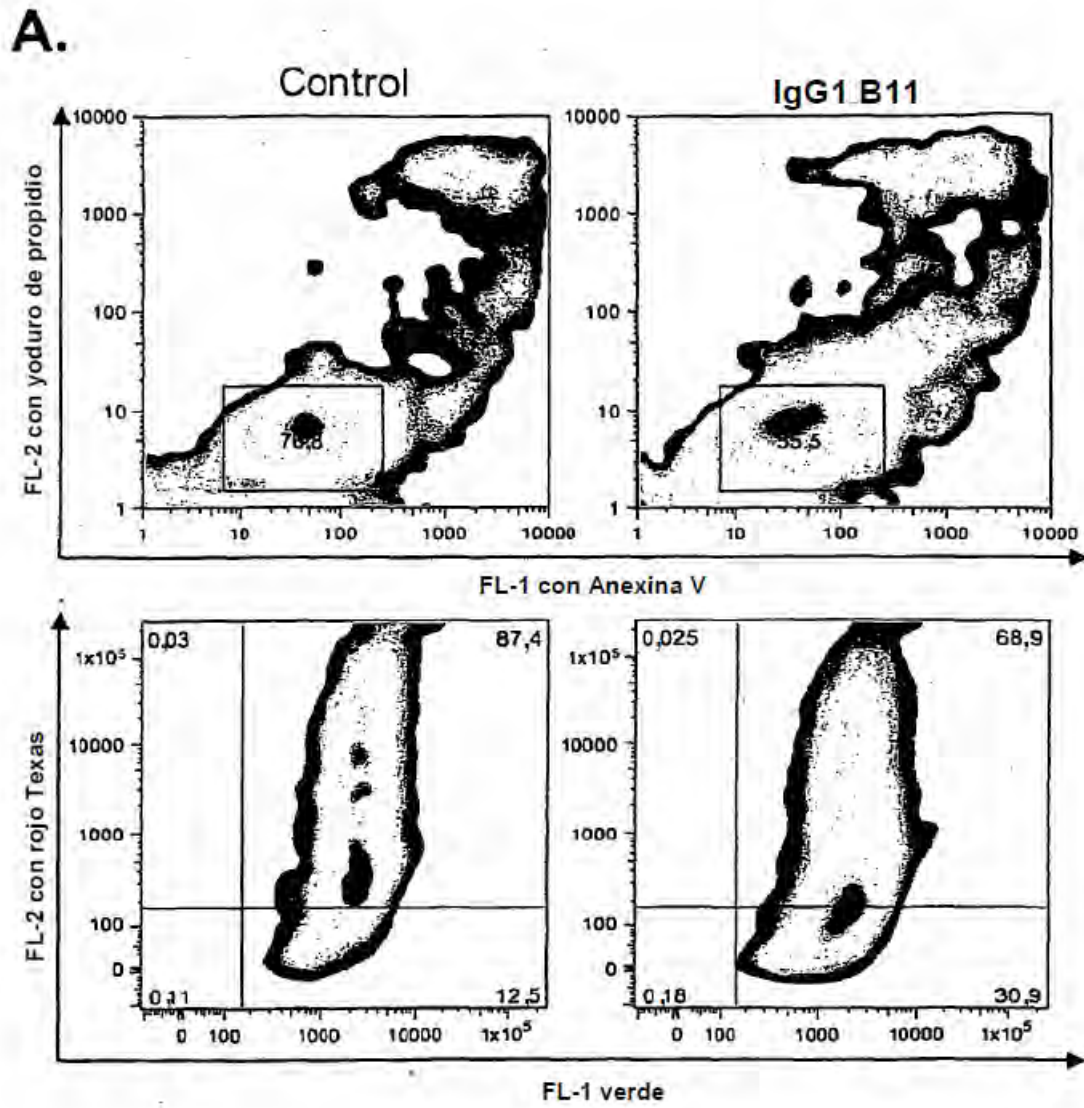
A.



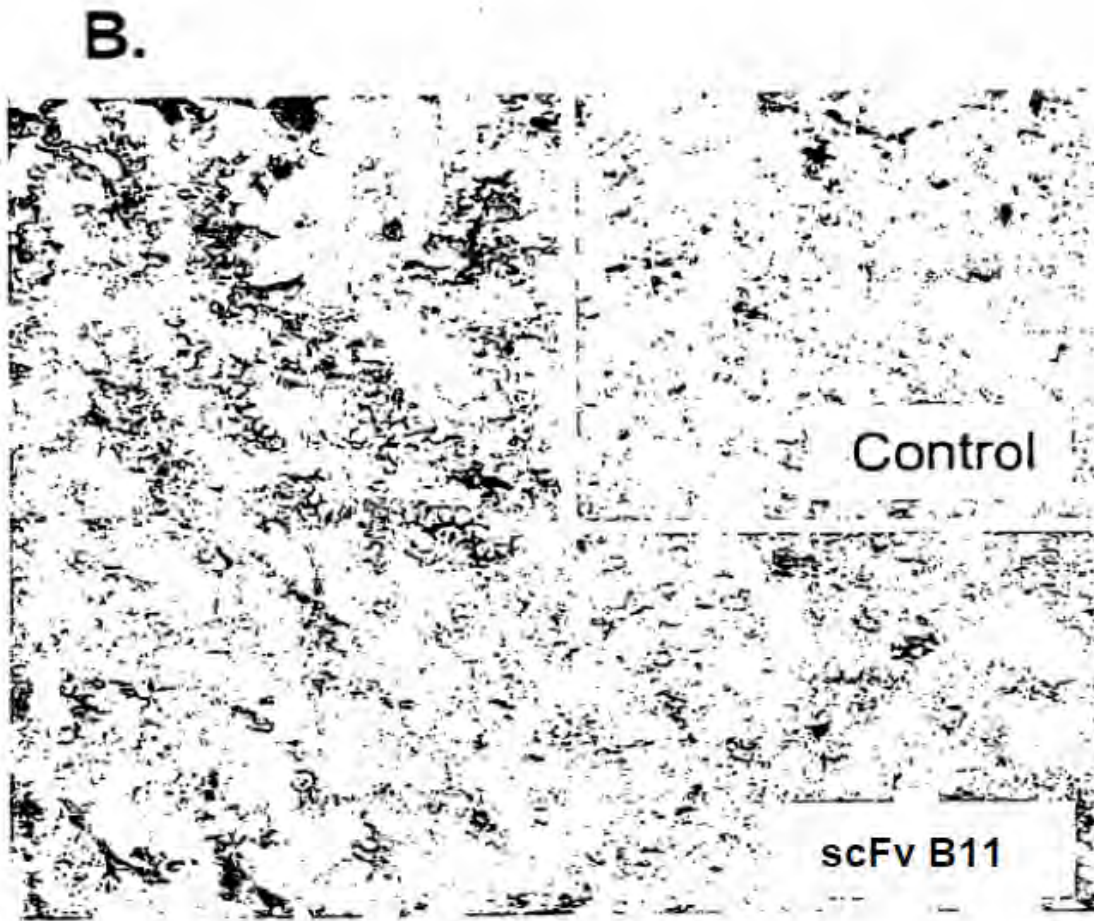
B.



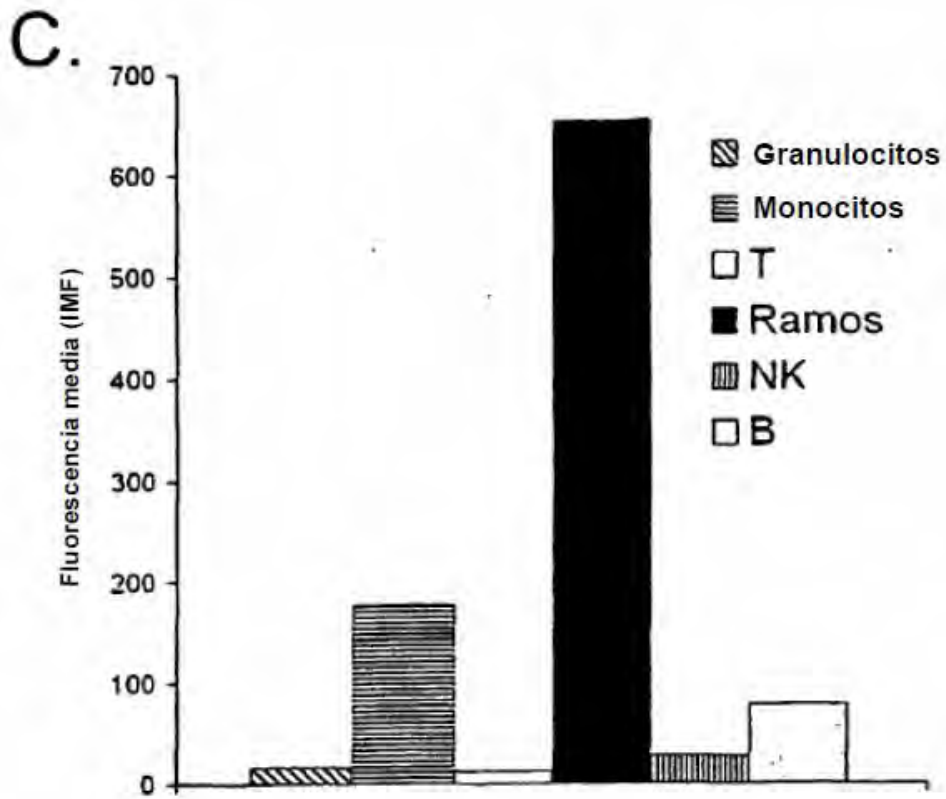
**Figura 3**



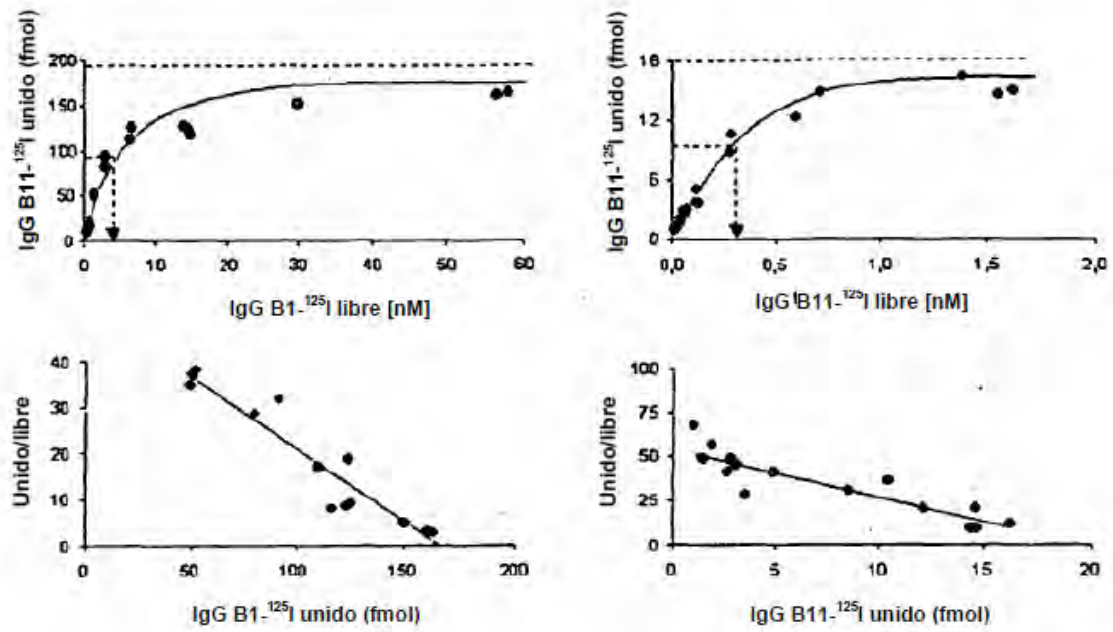
**Figura 4**



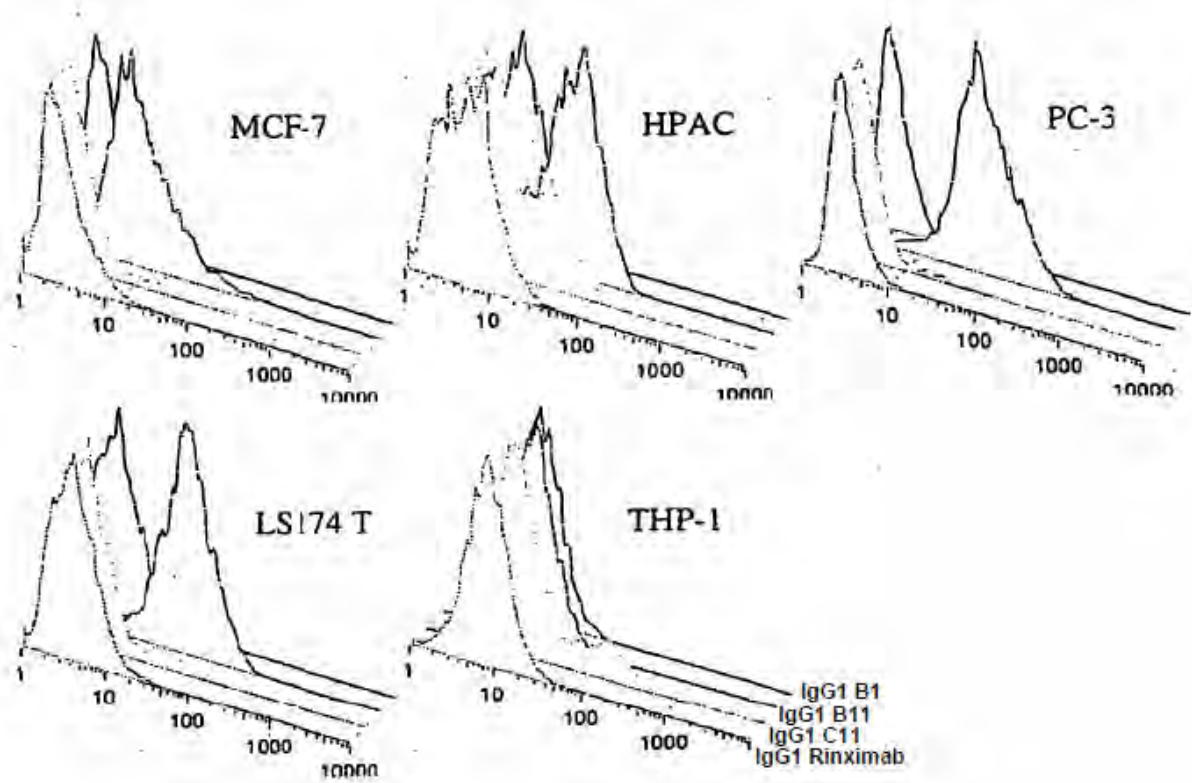
**Figura 4 (continuación)**



**Figura 4 (continuación)**



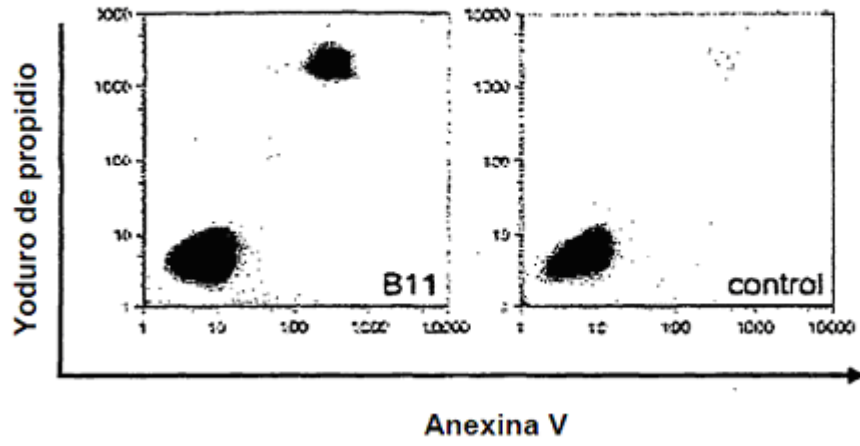
**Figura 5**



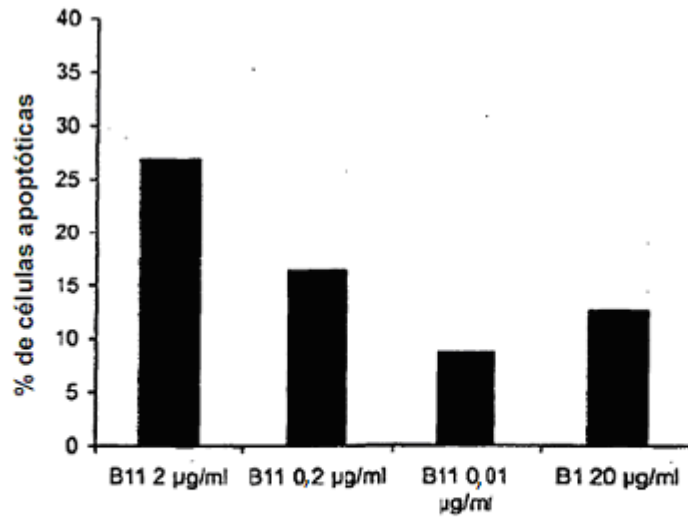
**Figura 6**



A.

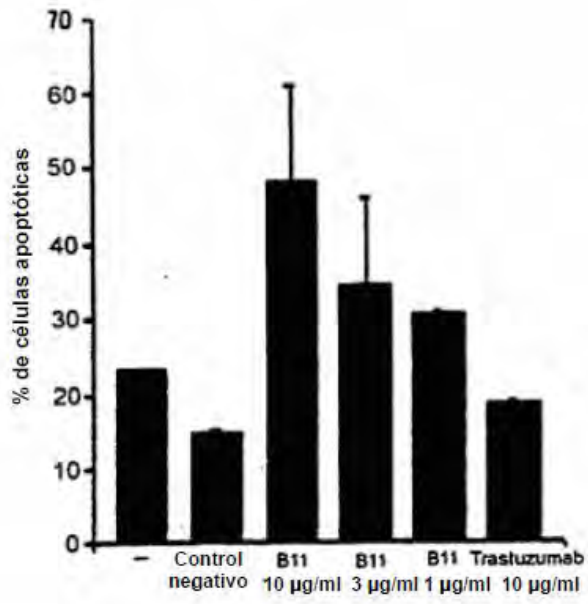


B.

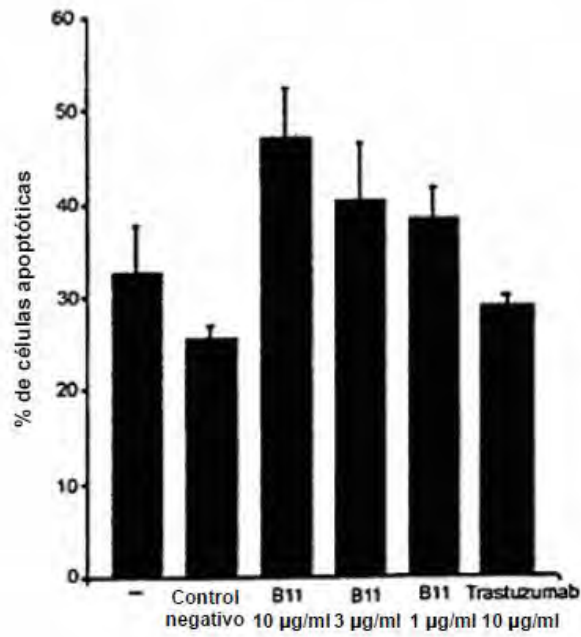


**Figura 7**

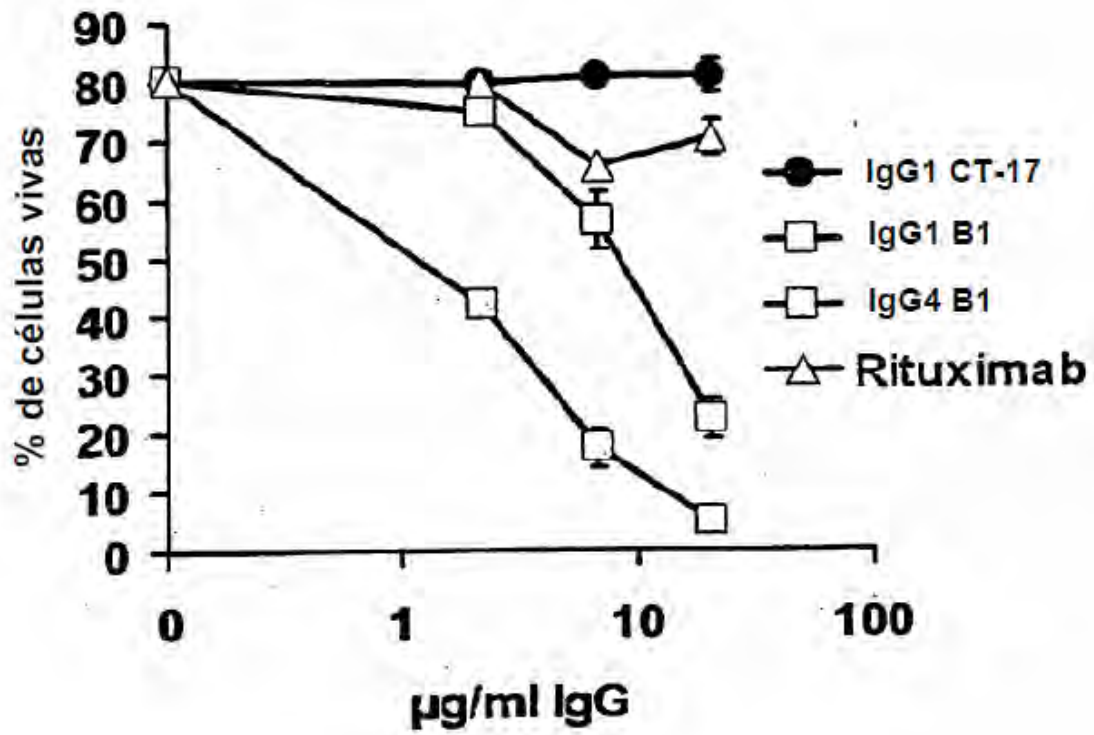
C.



D.



**Figura 7 (continuación)**



**Figura 8**

**VH de B1**

**Secuencia de nucleótidos:**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT  
GAGACTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCT  
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT  
AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTC  
CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG  
AGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGCTACTACCCCTTGACTAC  
TGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

**Secuencia de aminoácidos:**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISG  
SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGLLPLDY  
WGQGLVTVSS

**Figura 9**

**VL de B1**

**Secuencia de nucleótidos:**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGT  
CACCATCTCTTGTCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAGGGAATGCTGTAAATT  
GGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTÁTGAAAATAAT  
AAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTC  
AGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACT  
GCAGCTCATATGCGGTCAGCAACAATTTTCGAGGTGCTATTCGGCGGAGGAACC  
AAGCTGACGGTCCTAGGT

**Secuencia de aminoácidos:**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGGNAVNWYQQLPGTAPKLLIYENN  
KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYAVSNNFEVLFGGGT  
KLTVLG

***Figura 9 (continuación)***

**VH de B11**

**Secuencia de nucleótidos:**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT  
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCT  
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTATATGGTAT  
GATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTC  
CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG  
AGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGATACAGTGGCTGGTACTTTGACTAC  
TGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

**Secuencia de aminoácidos:**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVAFIYW  
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYSGWYFDY  
WGQGITLVTVSS

**Figura 10**

**VL de B11**

**Secuencia de nucleótidos:**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGT  
CACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTAC  
ACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCATCTATGATAAC  
ACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAC  
CTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATT  
ACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTCAGTGCTTGGCTGTTTCGGCGGAGGAACC  
AAGCTGACGGTCCTAGGT

**Secuencia de aminoácidos:**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDN  
NNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSAWLFGGGT  
KLTVLG

***Figura 10 (continuación)***

**VH de C11**

**Secuencia de nucleótidos:**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT  
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCGGCAGTTATGAAATGAACT  
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATAGC  
GGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGGAAGGCCGATTCACCATCTCCAG  
AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG  
ACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATACAAACCCGTACTACTACTACGGT  
ATGGACGTCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

**Secuencia de aminoácidos:**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYEMNWVRQAPGKGLEWVSVIYS  
GGSTYYADSVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTNPYYYYG  
MDVWGQGLTVTVSS

***Figura 11***



**VL de C11**

**Secuencia de nucleótidos:**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGT  
CACCATCTCCTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAATAATGCTGTAAACT  
GGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGGAATAAT  
CAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTC  
AGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACT  
GCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGAATGGTCAAGTATTCGGCGGAGGAACCAAG  
CTGACAGTCCTAGGT

**Secuencia de aminoácidos:**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYRNN  
QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYQCQSYDSSLNGQVFGGGTK  
LTVLG

***Figura 11 (continuación)***