

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 702**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2008 E 08756421 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2164992**

54 Título: **Composiciones y métodos para la unión al ácido lisofosfatídico**

30 Prioridad:

30.05.2007 US 940964 P

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

07.10.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 585 702 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la unión al ácido lisofosfatídico

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a agentes que se unen al ácido lisofosfatídico (LPA) y sus variantes, en particular a anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo y derivados de anticuerpo reactivos de forma específica con el LPA en condiciones fisiológicas. Los agentes de este tipo se pueden usar en el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades o trastornos a través de la administración de composiciones farmacéuticas que contienen tales agentes.

El LPA es un lípido bioactivo que actúa como mediador en múltiples respuestas celulares que incluyen proliferación, diferenciación, angiogénesis, motilidad, y protección de apoptosis en una diversidad de tipos celulares.

El LPA está implicado en el establecimiento y la progresión del cáncer al proporcionar un microentorno de crecimiento tumoral y estimulación de la angiogénesis. Además, el LPA se ha visto implicado en fibrosis, enfermedades oculares tales como degeneración macular, y trastornos relacionados con el dolor. Por lo tanto, un enfoque basado en anticuerpos con respecto a la neutralización del LPA ofrece la posibilidad de aumentar el arsenal de terapias actuales para estas indicaciones.

Los autores de la invención han inventado una familia de anticuerpos monoclonales específicos, de alta afinidad, contra LPA, uno de los cuales se conoce como Lpathomab o LT3000. La eficacia de Lpathomab en diversos modelos animales de cáncer, fibrosis y trastornos oculares destaca la utilidad de esta clase de anticuerpos anti-LPA (y moléculas derivadas del mismo), por ejemplo, en el tratamiento de trastornos neoplásicos, angiogénesis y trastornos relacionados con fibrosis.

Antecedentes de la invención

30 1. Introducción

La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para la comprensión de la presente invención.

35 2. Antecedentes

A. Lípidos de señalización bioactivos

En la actualidad, algunos lípidos y sus derivados se reconocen como dianas importantes para investigación médica, no solamente como elementos estructurales sencillos en membranas celulares o como una fuente de energía para β -oxidación, glicólisis u otros procesos metabólicos. En particular, ciertos lípidos bioactivos funcionan como mediadores importantes de señalización en enfermedades humanas y animales. Aunque la mayoría de los lípidos de la membrana plasmática desempeñan un papel exclusivamente estructural, una pequeña proporción de ellos están implicados en la transmisión de estímulos extracelulares en las células. Estos lípidos se conocen como "lípidos bioactivos" o, como alternativa, "lípidos de señalización bioactivos". "Señalización de lípidos" se refiere a cualquiera de una serie de rutas de transducción de señales celulares que usan lípidos de la membrana celular como segundos mensajeros, y también se refieren a la interacción directa de una molécula de señalización de lípido con su propio receptor específico. Algunas rutas de señalización de lípidos se activan con una diversidad de estímulos extracelulares, que varían de factores de crecimiento a citoquinas inflamatorias, y regulan algunas decisiones del destino celular, tales como apoptosis, diferenciación y proliferación. La investigación en señalización de lípidos bioactivos es un área de intensa investigación científica ya que cada vez se identifican más y más lípidos bioactivos y sus acciones se caracterizan.

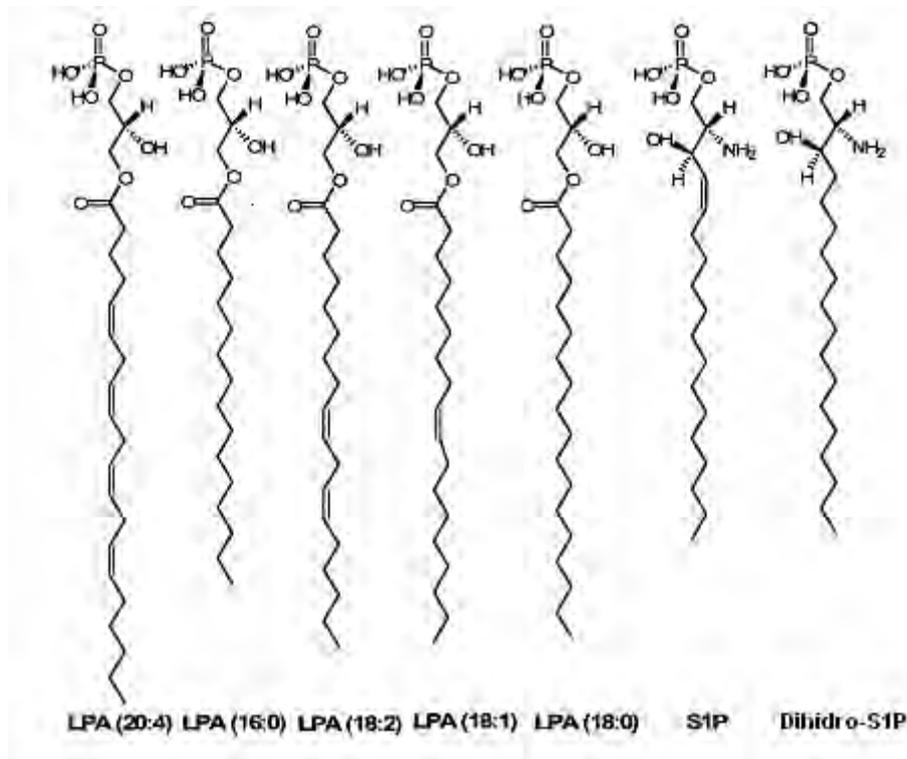
Algunos ejemplos de lípidos bioactivos son los eicosanoides (incluyendo los cannabinoides, leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienoicos y isoeicosanoides), mediadores de cannabinoides no eicosanoides, fosfolípidos y sus derivados tales como ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilglicerol (PG), factor de activación plaquetaria (PAF) y cardiolipinas así como lisofosfolípidos tales como lisofosfatidil colina (LPC) y diversos ácidos lisofosfatídicos (LPA). Algunos lípidos de señalización bioactivos también incluyen los esfingolípidos tales como esfingomielina, ceramida, ceramida-1-fosfato, esfingosina, esfingosilfosforil colina, esfinganina, esfinganina-1-fosfato (dihidro-S1P) y esfingosina-1-fosfato. Algunos esfingolípidos y sus derivados representan un grupo de moléculas de señalización extracelular e intracelular con efectos pleiotrópicos en procesos celulares importantes. Otros ejemplos de lípidos de señalización bioactivos incluyen fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PEA), diacilglicérido (DG), sulfátidos, gangliósidos y cerebrosidos.

65 1. Lisolípidos

Los lisofosfolípidos (LPL), también conocidos como lisolípidos, son lípidos de bajo peso molecular (por lo general

inferior a aproximadamente 500 dalton) que contienen una estructura principal de hidrocarburo individual y grupo de cabeza polar que contiene un grupo fosfato. Algunos lisolípidos son lípidos de señalización bioactivos. Dos ejemplos en particular de lípidos bioactivos médicamente importantes son LPA (cadena principal de glicerol) y S1P (cadena principal de esfingolípido). Las estructuras de los LPA, S1P, y dihidro S1P seleccionados se presentan a continuación.

5



La cadena principal estructural del LPA se obtiene a partir de fosfolípidos basados en glicerol tales como fosfatidilcolina (PC) o ácido fosfatídico (PA). En el caso de iso-esfingolípido tales como S1P, falta el ácido graso de la cadena principal de ceramida. La cadena principal estructural de S1P, dihidro S1P (DHS1P), y esfingosilfosforilcolina (SPC) se basa en la esfingosina, que se obtiene a partir de la esfingomielina.

10

LPA y S1P regulan diversas rutas de señalización celular mediante su unión a la misma clase de múltiples receptores acoplados a la proteína G de dominio transmembrana (GPCR). Los receptores de S1P se denominan S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 y S1P5 (anteriormente EDG-1, EDG-5/AGR16, EDG-3, EDG-6 y EDG-8) y los receptores de LPA se denominan LPA1, LPA2, LPA3 (anteriormente, EDG-2, EDG-4, y EDG-7). Se ha identificado un cuarto receptor de LPA de esta familia para LPA (LPA4), y también se ha informado de otros supuestos receptores para estos lisofosfolípidos.

15

Se ha mostrado que LPA y S1P desempeñan un papel en la respuesta inmunológica a través de población de células relacionadas con el sistema inmunológico tales como linfocitos T y B. Estos lípidos estimulan la migración de linfocitos T a sitios de respuesta inmunológica y regulan la proliferación de los linfocitos T así como la secreción de diversas citoquinas. En particular, se cree que S1P controla la salida de linfocitos en la circulación periférica. Por lo tanto, se cree que algunos agentes que se unen a LPA y S1P son útiles en métodos para disminuir una respuesta inmunológica no deseada, excesiva o anómala, y para el tratamiento de enfermedades y afecciones, incluyendo ciertos cánceres hematológicos y trastornos autoinmunitarios que están asociados con la implicación no deseada, excesiva o anómala de linfocitos y/o una respuesta inmunológica anómala.

25

a. Ácido lisofosfatídico (LPA)

30

El ácido lisofosfatídico (mono-acilglicerol-3-fosfato, < 500 Dalton) consiste en una cadena principal de hidrocarburo individual y un grupo de cabeza polar que contiene un grupo fosfato. El LPA no es una identidad molecular individual sino una colección de variantes estructurales endógenas con ácidos grasos de longitudes y grados de saturación variables. Algunas variantes de LPA biológicamente relevantes incluyen 18:2, 18:1, 18:0, 16:0 y 20:4. Se han detectado algunas especies de LPA tanto con ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0) como con ácidos grasos insaturados (16:1, 18:1, 18:2, y 20:4) en suero y plasma. Las isoformas 16:0, 18:1, 18:2 y 20:4 del LPA son las especies predominantes en la sangre. Algunos niveles significativos (> 1 μ M) de LPA bioactivo se pueden detectar en diversos fluidos corporales, incluyendo suero, saliva, fluido folicular y efusiones malignas.

35

La presente invención proporciona entre sus aspectos anticuerpos anti-LPA monoclonales que son útiles para tratar o prevenir trastornos hiperproliferativos y otros trastornos diversos, como se describe con mayor detalle a continuación. En particular, ciertas realizaciones de la invención se refieren a anticuerpos dirigidos a LPA que incluyen, pero no se limitan a, las variantes 18:2, 18:1, 18:0, 16:0, y 20:4 de LPA. Aunque la producción de anticuerpos anti-LPA se menciona brevemente en Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (vol. 46, 14 de abril de 2007, página 971, mencionado como D1), en el presente documento no se desvelaron anticuerpos específicos. Además, un anticuerpo de LPA policlonal se describió en Chen *et al.*, en 2000 (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Pergamon, Elsevier Science, GB; vol. 10, n.º 15, páginas 1691-1693, mencionado como D2).

Desde hace tiempo, los LPA se han conocido como precursores de la biosíntesis de fosfolípidos en células tanto eucariotas como procariotas, pero los LPA han aparecido solo recientemente como moléculas de señalización que se producen rápidamente y se liberan por células activadas, en particular plaquetas, para influir en células diana mediante acción en receptor de superficie celular específico. Además de ser sintetizado y procesado a fosfolípidos más complejos en el retículo endoplasmático, el LPA se puede generar a través de la hidrólisis de fosfolípidos existentes previamente después de activación celular; por ejemplo, en la posición sn-2 falta normalmente un resto de ácido graso debido a desacilación, dejando solamente el resto sn-3 hidroxilo esterificado a un ácido graso. Además, una enzima fundamental en la producción de LPA, autotaxina (lisoPLD/NPP2), puede ser el producto de un oncogén, al igual que muchos tipos de tumores regulan de forma positiva la autotaxina. Las concentraciones de LPA en plasma y suero humanos se han informado, incluyendo las determinaciones realizadas usando procedimientos de LC/EM sensibles y específicos. Por ejemplo, en suero humano recién preparado al que se le permite sedimentar a 25 °C durante una hora, se ha calculado que las concentraciones de LPA son aproximadamente 1,2 mM, con los análogos del LPA, 16:0, 18:1, 18:2, y 20:4, siendo las especies predominantes. De forma análoga, en plasma humano recién preparado al que se le permite sedimentar a 25 °C durante una hora, se ha calculado que las concentraciones de LPA son aproximadamente 0,7 mM, con LPA 18:1 y 18:2 siendo las especies predominantes.

El LPA media sus funciones biológicas predominantemente mediante unión a una clase de múltiples receptores acoplados a proteína G transmembrana (GPCR). Hasta la fecha se han identificado cinco GPCR específicos de LPA, denominados LPA1-5; éstos muestran tanto solapamiento como propiedades de señalización y expresión de tejido distintas. Los receptores LPA1-3 pertenecen a la denominada subfamilia EDG (EGD2/LPA1, EDG4/LPA2, y EDG7/LPA3) de los GPCR con una similitud de secuencias de un 50 % entre sí. Su homólogo más cercano es el receptor CB1 cannabinoide, que se une a los lípidos bioactivos 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) y araquidonoil-etanolamina. Dos receptores de LPA recién identificados, denominados LPA4 (anteriormente GPR23/p2y9) y LPA5 (anteriormente GPR92) están mucho más relacionados con los receptores de nucleótidos de P2Y. Además, el LPA reconoce al receptor intracelular, PPRgamma.

LPA1 se expresa en una amplia gama de tejidos y órganos mientras que LPA2 y LPA3 muestran un perfil de expresión más limitado. Sin embargo, se mostró que las expresiones de LPA2 y LPA3 aumentaban en cánceres de ovario y colon e inflamación, lo que sugiere que el papel principal de LPA2 y LPA3 se produce en condiciones patofisiológicas.

El papel de estos receptores se ha esclarecido en parte mediante estudios de supresión genética de receptor en ratones. Los ratones con déficit de LPA1 muestran una letalidad postnatal parcial debido a un defecto de acción que resulta de una alteración del olfato. Los ratones con déficit de LPA1 también están protegidos de fibrosis pulmonar como respuesta a lesión pulmonar inducida por bleomicina. Además, los ratones que carecen del gen receptor de LPA1 pierden los comportamientos y fenómenos de dolor neuropático inducidos por lesión nerviosa.

Por el contrario, los ratones que carecen de receptores LPA2 parece que son normales. Los ratones con supresión genética del receptor LPA3 presentan una reducción del tamaño de su camada debido a un retraso del implante de blastocitos y alteración del espaciamiento embrionario, y los punteros con déficit de LPA3 muestran una reducción de la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y síntesis de prostaglandina; mientras que se ha informado que la administración exógena de PGE2 en ratones hembra con déficit de LPA3 salvar el defecto de implante.

Los LPA influyen en una amplia gama de respuestas biológicas, que incluyen inducción de proliferación celular, estimulación de la migración celular y retracción de neuritas, cierre de unión de huesos, e incluso quimiotaxis del moho del limo. El cúmulo de conocimientos con respecto a la biología del LPA continúa creciendo a medida que se someten a ensayo más y más sistemas celulares para la respuesta de LPA. Los efectos fisiológicos y patofisiológicos principales de LPA incluyen, por ejemplo:

Curación de heridas: ahora se sabe que, además de estimular el crecimiento y la proliferación celular, el LPA estimula la tensión celular y la unión a fibronectina de la superficie celular, que son sucesos importantes en la reparación y regeneración de heridas.

Apoptosis: recientemente, la actividad antiapoptótica también se ha atribuido a LPA, y recientemente se ha informado que el receptor gamma de proliferación de peroxisomas es un receptor/diana para LPA.

Maduración de vasos sanguíneos: la autotaxina, una lisofosfolipasa D secretada responsable de la producción de los LPA, es esencial para la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo. Además, los LPA insaturados

se identificaron como principales contribuyentes para la inducción de la desdiferenciación de células del músculo liso vascular.

Edema y permeabilidad vascular: el LPA induce la exudación de plasma y liberación de histamina en ratones.

5 Inflamación: el LPA actúa como mediador inflamatorio en células epiteliales de córnea humana. El LPA participa en la curación de heridas en la córnea y estimula la liberación de ROS en el cristalino. El LPA también puede volver a activar el HSV-1 en córnea de conejo.

10 La picadura de la araña venenosa, *Loxosceles reclusa* (araña reclusa parda), causa úlceras necróticas que pueden causar daños graves y daño tisular de larga duración, y en ocasiones la muerte. La patología de las heridas generadas por la picadura de esta araña consiste en una respuesta inflamatoria intensa mediada por AA y prostaglandinas. El componente principal del veneno de la araña *L. reclusa* es la enzima fosfolipasa D denominada a menudo esfingomielinasa D (SMasa D), que hidroliza la esfingomielina para producir C1P. Sin embargo se ha encontrado que los lisofosfolípidos con una diversidad de grupos de cabeza son hidrolizados por la enzima de *L. reclusa* para liberar LPA. Se cree que algunos agentes anti-LPA tales como los de la invención serán útiles para
15 reducido para tratar inflamación de diversos tipos, que incluye, pero no se limita a, inflamación resultante de envenenamiento por *L. reclusa*.

20 Fibrosis y formación de cicatrices: el LPA inhibe la estimulación mediada por TGF de la estabilidad del ARNm del colágeno de tipo I a través de una ruta dependiente de ERK en fibroblastos dérmicos. Por otra parte, el LPA tiene algunos efectos fibrogénicos directos mediante la estimulación de la expresión genética del colágeno y la proliferación de fibroblastos.

25 Respuesta inmunológica: se ha mostrado que LPA, al igual que S1P, desempeña un papel en la respuesta inmunológica a través de la modulación de células relacionadas con el sistema inmunológico. Estos lípidos estimulan la migración de linfocitos T a sitios de respuesta inmunológica y regulan la proliferación de linfocitos T así como secreción de diversas citoquinas.

30 Por lo tanto, se cree que algunos agentes que reducen la concentración eficaz de LPA, tales como mAb anti-LPA de Lpath son útiles en métodos para el tratamiento de enfermedades y afecciones tales como las asociadas con curación de heridas y fibrosis, apoptosis, angiogénesis y neovascularización, permeabilidad vascular e inflamación, que están asociadas con un nivel excesivo o anómalo, no deseado de LPA.

35 Recientemente, los solicitantes han desarrollado varios anticuerpos monoclonales frente a los LPA. Estos anticuerpos anti-LPA pueden neutralizar diversos LPA y mitigar su acción biológica y farmacológica. Por lo tanto, se cree que algunos anticuerpos anti-LPA son útiles en la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades y afecciones asociadas con niveles no deseados o anómalos, excesivos de LPA.

40 También se desean métodos rápidos y específicos para detectar LPA. Se conocen algunos métodos para separar y medir de forma semicuantitativa los fosfolípidos tales como LPA usando técnicas tales como cromatografía en capa fina (TLC), seguido por cromatografía de gases (GC) y/o espectrometría de masas (EM). Por ejemplo, algunos lípidos se pueden extraer de la muestra de ensayo de fluido corporal. Como alternativa, la cromatografía en capa fina se puede usar para separar diversos fosfolípidos. A continuación, los fosfolípidos y los lisofosfolípidos se pueden visualizar en placas, por ejemplo, usando luz ultravioleta. Como alternativa, algunas concentraciones de lisofosfolípido se pueden identificar por RMN o HPLC después del aislamiento de los fosfolípidos o como parte del
45 fosfolípido. Los niveles de LPA también se han determinado en ascitis de pacientes con cáncer de ovario usando un ensayo que se basa en efectos específicos de lisoPA en células eucariotas en cultivo. Sin embargo, estos procedimientos anteriores requieren mucho tiempo, son costosos y variables y por lo general solamente semicuantitativos. También se conocen algunos métodos enzimáticos para detectar lisofosfolípidos tales como LPA en fluidos biológicos, y para correlacionar y detectar afecciones asociadas niveles alteración de los niveles de
50 lisofosfolípidos. Documentos de patente de Estados Unidos n.º 6.255.063 y 6. 248.553.

3. Definiciones

55 Antes de describir la presente invención con detalle, se definirán varios términos usados en el contexto de la presente invención. Además de esos términos, si fuera necesario se definen otros en cualquier parte en la memoria descriptiva. A menos que se defina de forma expresa de otro modo en el presente documento, los términos de la técnica usados en la presente memoria descriptiva tendrán sus significados reconocidos en la técnica.

60 El término "anómalo" se refiere a excesivo o no deseado, por ejemplo en referencia a niveles o concentraciones eficaces de una diana celular tal como una proteína o lípido bioactivo.

65 El término "anticuerpo" ("Ab") o "inmunoglobulina" (Ig) se refiere a cualquier forma de un péptido, polipéptido que se obtiene a partir de, moderados después de o codificado por, un gen de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo, que es capaz de unirse a un antígeno o epítopo. Véase, por ejemplo, Immunobiology, Quinta Edición, C. A. Janeway, P. Travers, M., Walport, M.J. Shlomchik, ed. Garland Publishing (2001). El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en su sentido más amplio, e incluye anticuerpos monoclonales, policlonales o

multiespecíficos, minicuerpos, heteroconjugados, diacuerpos, triacuerpos, quiméricos, anticuerpos, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpo, y agentes de unión que usan las CDR (o variante de las mismas que retenga la actividad de unión antígeno) del anticuerpo precursor. En el presente documento, se define que los anticuerpos retienen al menos una actividad deseada del anticuerpo precursor. Algunas actividades deseadas pueden incluir la capacidad para unirse al antígeno de forma específica, la capacidad para inhibir la proliferación *in vitro*, la capacidad para inhibir la angiogénesis *in vivo*, y la capacidad para alterar el perfil o perfiles de citoquina *in vitro*. En el presente documento, anticuerpos y fragmentos, variantes y derivados de anticuerpo también pueden hacer referencia a "restos derivados del sistema inmunológico", en los que tales moléculas, o al menos la parte(s) de unión al antígeno de las mismas, se han obtenido a partir de un anticuerpo anti-LPA.

Los anticuerpos nativos (inmunoglobulinas nativas) son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Daltons, formadas por lo general por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Por lo general, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH), seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Algunos restos de aminoácidos en particular forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

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

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

Un "derivado de anticuerpo" es un resto que se obtiene a partir del sistema inmunológico, es decir, una molécula que se obtiene a partir de un anticuerpo. Esto comprende, por ejemplo, variantes de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos multivalentes, conjugados de anticuerpo y similares, que retienen un nivel deseado de actividad de unión al antígeno.

Como se usa en el presente documento, "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto que incluye el sitio de unión a antígeno o regiones variables de un anticuerpo intacto, en el que la parte puede estar libre de él los dominios constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH2, CH3, y CH4) de la región Fc del anticuerpo intacto. Como alternativa, algunas partes de los dominios constantes de cadena pesada (por ejemplo, CH2, CH3, y CH4) pueden estar incluidos en el "fragmento de anticuerpo". Algunos fragmentos de anticuerpo retienen unión al antígeno e incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, y Fv; diacuerpos; triacuerpos; moléculas de anticuerpo de una sola cadena (sc-Fv); minicuerpos, nanocuerpos, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno aún es capaz de reticulación con antígeno. A modo de ejemplo, un fragmento Fab también contiene el dominio constante de una cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada. "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región consta de un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación no covalente, estrecha. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. De forma colectiva, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad y unirse a antígeno, aunque a una afinidad menor que todo el sitio de unión. Los fragmentos de anticuerpo de "Fv de una sola cadena" o "sFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Por lo general, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

El fragmento de Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de Fab' se diferencian de los fragmentos de Fab por la adición de unos pocos

restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteína(s) de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para Fab' en el que el resto(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos de Fab' que tienen cisteína bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo anti-LPA "variante", se refiere en el presente documento a una molécula que se diferencia en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-LPA nativo en virtud de adición, delección y/o sustitución de uno o más resto(s) de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo y que retiene al menos una actividad deseada del anticuerpo anti-unión precursor. Algunas actividades deseadas pueden incluir la capacidad para unirse al antígeno de forma específica, la capacidad para inhibir la proliferación *in vitro*, la capacidad para inhibir la angiogénesis *in vivo*, y la capacidad para alterar el perfil de citoquina *in vitro*. El cambio(s) del aminoácido en una variante de anticuerpo puede estar dentro de una región variable o una región constante de una cadena ligera y/o una cadena pesada, incluyendo en la región Fc, la región Fab, el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3, y la región bisagra. En una realización, la variante comprende una o más sustitución(s) de aminoácidos en una o más región(s) hipervariable del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos uno, por ejemplo de aproximadamente uno a aproximadamente diez, y preferentemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco, sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo precursor. De forma habitual, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 65 % con las secuencias de dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo precursor, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, y lo más preferentemente al menos un 95 %. En algunas situaciones, es preferente una identidad de secuencias de al menos un 50 %, en la que otras características de la molécula expresan atributos deseados tales como unión y especificidad. En el presente documento, identidad u homología respecto a esta secuencia se define como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los restos del anticuerpo precursor, después de alineamiento de las secuencias e introducción de huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencias. Se debería interpretar que ninguna de las extensiones, delecciones o inserciones N-terminales, C-terminales, o internas en la secuencia del anticuerpo influye en la identidad u homología de la secuencia. La variante retiene la capacidad de unirse a LPA y preferentemente tiene actividades deseadas que son superiores a las del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, aumento de la capacidad para reducir la angiogénesis y/o detener la progresión del tumor. Para analizar propiedades deseadas de este tipo (por ejemplo, inmunogénica as, semivida más larga, aumento de la estabilidad, aumento de la potencia), se debería comparar una forma de Fab de la variante con una forma Fab del anticuerpo precursor o una forma de longitud completa de la variante con una forma de longitud del anticuerpo precursor, por ejemplo, ya que se ha encontrado que el formato del anticuerpo anti-esfingolípido influye en su actividad en los ensayos de actividad biológica desvelados en el presente documento. El anticuerpo variante de interés en particular en el presente documento puede ser uno que presente al menos aproximadamente 10 veces, preferentemente al menos aproximadamente en %, 5, 25, 59, o más de al menos una actividad deseada. La variante preferente es una que tenga propiedades biofísicas superiores tal como se mide *in vitro* o actividades biológicas superiores tal como se mide *in vitro* o *in vivo* cuando se compara con el anticuerpo precursor.

Un "agente anti-LPA" se refiere a cualquier agente terapéutico que se una a LPA, e incluye anticuerpos, variantes de anticuerpo, moléculas derivadas de anticuerpo o moléculas no derivadas de anticuerpo que se unen a LPA y sus variantes.

Un "lípidio bioactivo" se refiere a una molécula de señalización de lípido. Los lípidos bioactivos se distinguen de los lípidos estructurales (por ejemplo, fosfolípidos unidos a membrana) en que median la señalización extracelular y/o intracelular y de ese modo están implicados en el control de la función de muchos tipos de células mediante modulación, diferenciación, migración, proliferación, secreción, supervivencia y otros procesos. *In vivo*, algunos lípidos bioactivos se pueden encontrar en fluidos extracelulares, en los que pueden formar complejos con otras moléculas, por ejemplo, proteínas de suero tales como albúmina y lipoproteínas, o en forma "libre", es decir, no forman complejos con otra especie de molécula. Como mediadores extracelulares, algunos lípidos bioactivos alteran la señalización celular mediante la activación de canales iónicos unidos a membrana o GPCR o enzimas o factores que, a su vez, activan sistemas de señalización de complejos que dan como resultado cambios en la función o supervivencia celular. Como mediadores intracelulares, algunos lípidos bioactivos pueden ejercer su acción mediante interacción directa con componentes intracelulares tales como enzimas, canales iónicos, o elementos estructurales tales como actina.

Algunos ejemplos de lípidos bioactivos incluyen esfingolípidos tales como ceramida, ceramida-1-fosfato (C1P), esfingosina, esfinganina, esfingosilfosforilcolina (SPC) y esfingosina-1-fosfato (S1P). Algunos esfingolípidos y sus derivados y metabolitos se caracterizan por una cadena principal esfingoide (derivada de la esfingomielina). Algunos esfingolípidos y sus derivados y metabolitos representan un grupo de moléculas de señalización extracelular e intracelular con efectos pleiotrópicos en procesos celulares importantes. Éstos incluyen sulfátidos, gangliósidos y cerebrósidos. Otros lípidos bioactivos se caracterizan por una cadena principal basada en glicerol; por ejemplo, lisofosfolípidos tales como lisofosfatidil colina (LPC) y diversos ácidos lisofosfatídicos (LPA), así como

fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PEA), ácido fosfatídico, factor de activación plaquetaria (PAF), cardiolipina, fosfatidilglicerol (PG) y diacilglicérido (DG). Además, otros lípidos bioactivos se obtiene a partir del ácido araquidónico; estos incluyen los eicosanoides (incluyendo los metabolitos eicosanoides tales como los HETE, cannabinoides, leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienoicos, e isoeicosanoides), mediadores cannabinoides no eicosanoides. Otros lípidos bioactivos, incluyendo otros fosfolípidos y sus derivados, también se pueden usar de acuerdo con la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención puede ser preferente dirigir bioactivos lípidos basados en glicerol (los que tienen una cadena principal derivada de glicerol, tal como los LPA) para producción de anticuerpo, en oposición a los lípidos bioactivos basados en esfingosina (los que tienen una cadena principal esfingoide, tales como esfingosina y S1P). En otras realizaciones, se puede desear la dirección de lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico para generación de anticuerpo, y en otras realizaciones son preferentes los lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico y derivados de glicerol pero no lípidos bioactivos derivados de esfingoide. En conjunto, los lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico y derivados de glicerol se pueden denominar en el presente documento "lípidos bioactivos no esfingoides".

De la clase de lípidos bioactivos de acuerdo con la invención están excluidos de forma específica fosfatidilcolina y fosfatidilserina, así como sus metabolitos y derivados que funcionan principalmente como miembros estructurales de la laminilla interna y/o externa de las membranas celulares.

La expresión "biológicamente activo", en el contexto de un anticuerpo o fragmento o variante de anticuerpo, se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o variante de anticuerpo que es capaz de unirse al epítipo deseado y en cierto modo ejercen un efecto biológico. Algunos efectos biológicos incluyen, pero no se limitan a, la modulación de una señal de crecimiento, la modulación de una señal antiapoptótica, la modulación de una señal apoptótica, la modulación de la cascada de función efectuará, y modulación de otras interacciones de ligando.

Un "biomarcador" es un agente bioquímico específico en el organismo que tiene una característica molecular en particular que le hace útil para medir la evolución de la enfermedad por los efectos del tratamiento. Por ejemplo, S1P es un biomarcador para ciertas afecciones hiperproliferativas y/o cardiovasculares.

"Terapia cardiovascular" incluye terapia cardíaca (tratamiento de isquemia del miocardio e insuficiencia cardíaca) así como la prevención y/o tratamiento de otras enfermedades asociadas con el sistema cardiovascular, tal como enfermedad cardíaca. La expresión "enfermedad cardíaca" incluye cualquier tipo de enfermedad, trastorno, traumatismo o tratamiento quirúrgico que se relacione con el tejido cardíaco o del miocardio. Son de interés en particular las afecciones asociadas con la remodelación tisular. La expresión "agente cardioterapéutico" se refiere a un agente que es terapéutico para enfermedades y enfermedades causadas por o asociadas con enfermedades y trastornos cardíacos y del miocardio.

Un "vehículo" se refiere a un resto adaptado para conjugación con un hapteno, haciendo de ese modo que el hapteno sea inmunogénico. Una clase no limitante, representativa de vehículos son las proteínas, ejemplos de las cuales incluyen albúmina, hemocianina de lapa californiana, hemaglutinina, tétanos, y toxoide de difteria. Otras clases y ejemplos de vehículos adecuados para uso de acuerdo con la invención se conocen en la técnica. Estos, así como algunos vehículos de origen natural o sintéticos descubiertos o inventados posteriormente, se pueden adaptar para aplicación de acuerdo con la invención.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan de forma indistinta y todas las denominaciones de este tipo incluyen progenie. Por tanto, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de las mismas sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Está incluida la progenie mutante que tienen la misma función o actividad biológica tal como se identifica sistemáticamente en la célula originalmente transformada. Cuando se hace referencia a distintas denominaciones, será evidente a partir del contexto.

La expresión "agente quimioterapéutico" significa se refiere a agentes anticáncer y otros agentes antihiperproliferativos. Por lo tanto, algunos agentes quimioterapéuticos son un subconjunto de agentes terapéuticos en general. Algunos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a: agentes que dañan el ADN y agentes que inhiben la síntesis del ADN: antraciclinas (doxorubicina, donorrubicina, epirubicina), agentes de alquilación (bendamustina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida, dacarbazina, hexametilmelamina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, mitotano, mitomicina, pipobromano, procarbazona, estreptozocina, tiotepa, y trietilenomelamina), derivados de platino (cisplatino, carboplatino, cis diamina-dicloroplatino), e inhibidores de la topoisomerasa (Camptosar); antimetabolitos tales como capecitabina, clorodesoxiadenosina, citarabina (y su forma activada, ara-CMP), arabinósido de citosina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, 5-DFUR, gemcitabina, hidroxiurea, 6-mercaptapurina, metotrexato, pentostatina, trimetrexato, 6-tioguanina); antiangiogénicos (bevacizumab, talidomida, sunitinib, lenalidomida, TNF-470, 2-metoxiestradiol, ranibizumab, sorafenib, erlotinib, bortezomib, pegaptanib, endostatina); agentes de interrupción vascular (flavonoides/flavonas, DMXAA, derivados de combretastatina tales como CA4DP, ZD6126, AVE8062A, etc.); agentes biológicos tales como anticuerpos

(Herceptin, Avastin, Panorex, Rituxin, Zevalin, Mylotarg, Campath, Bexxar, Eribitux); terapia endocrina: inhibidores de la aromatasas (4-hidroandrostendiona, exemestano, aminoglutetimida, anastrozol, letozol), antiestrógenos (Tamoxifeno, Toremifina, Raioxifeno, Faslodex), esteroides tales como dexametasona; agentes inmunomoduladores: citoquina las tales como IFN-beta e IL2), inhibidores para integrinas, otras proteínas de adhesión y metaloproteinasas de matriz); inhibidores de la histona desacetilasa tales como ácido suberoilánilida hidroxámico; inhibidores de transducción de señales tales como inhibidores de tirosina quinasas tales como imatinib (Gleevec); inhibidores de proteínas de choque térmico tales como 17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamicina; retinoides tales como todos los ácidos trans retinoicos; inhibidores de factores de crecimiento o los factores de crecimiento por sí mismos; compuestos antimitóticos y/o agentes de despolimerización de tubulina tales como los taxoides (paclitaxel, docetaxel, taxotere, BAY 59-8862), navelbina, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina; agentes antiinflamatorios tales como inhibidores de la CO x y reguladores del ciclo celular, por ejemplo, reguladores del control e inhibidores de la telomerasa.

El término anticuerpo "quimérico" (o inmunoglobulina) se refiere a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera que es idéntica con u homóloga a secuencias correspondientes anticuerpos derivada de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo en particular, aunque el resto de la cadena(s) es idéntico con u homólogo a secuencias correspondientes anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (Cabilly, *et al.*, a continuación; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 81: 6851 (1984)). Las secuencias de anticuerpos pueden ser de origen en vertebrado o invertebrado, por ejemplo, de mamíferos, aves o peces, incluyendo peces cartilaginosos, roedores, caninos, felinos, animales ungulados y primates, incluyendo seres humanos.

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

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

Un "lípidio bioactivo derivatizado" es un lípidio bioactivo, por ejemplo, LPA, que tiene un grupo de cabeza polar y al menos una cadena de hidrocarburos, en el que un átomo de carbono dentro de la cadena de hidrocarburos se derivatiza con un grupo reactivo colgante [por ejemplo, un grupo sulfhidrilo (tiol), un grupo ácido carboxílico, un grupo ciano, un éster, un grupo hidroxilo, un alqueno, un alquino, un grupo cloruro de ácido o un átomo de halógeno] que puede estar protegido o no. Esta derivatización sirve para activar al lípidio bioactivo para reacción con una molécula, por ejemplo, para conjugación con un vehículo.

Un "conjugado de lípidio bioactivo derivatizado" se refiere a un lípidio bioactivo derivatizado que se conjuga covalentemente con un vehículo. El vehículo puede ser una molécula de proteína o puede ser un resto tal como polietilenglicol, oro coloidal, adyuvantes o perlas de sílica. Un conjugado de lípidio bioactivo derivatizado se puede usar como un inmunógeno para la generación de una respuesta a anticuerpo de acuerdo con la presente invención, y el mismo conjugado de lípidio bioactivo o uno diferente se puede usar como un reactivo de detección para detectar el anticuerpo producido de este modo. En algunas realizaciones el conjugado lípidio bioactivo derivatizado se une a un soporte sólido Hasta cuando se usa para detección.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena poli peptídica (VH - VL). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen de forma más completa, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO

93/11161; y en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

"Concentración eficaz" se refiere a la concentración y/o actividad absoluta, relativa y/o disponible de, por ejemplo, ciertos lípidos bioactivos deseados. En otras palabras, la concentración eficaz de un lípido bioactivo es la cantidad de lípido disponible, y capaz, de realizar su función biológica. En la presente invención, un resto derivado del sistema inmunológico tal como, por Ejemplo, un anticuerpo monoclonal dirigido a un lípido bioactivo (tal como, por ejemplo, C1P) es capaz de reducir la concentración eficaz del lípido mediante la unión al lípido y haciendo que sea incapaz de realizar su función biológica. En este ejemplo, el lípido en sí mismo todavía está presente (no se degrada por el anticuerpo, en otras palabras), pero ya no se puede unir a su receptor u otras dianas para causar un efecto cadena abajo, por lo que la "concentración eficaz" en lugar de la concentración absoluta es la medición apropiada. Existen métodos y ensayos para medir de forma directa y/o indirecta las concentraciones eficaces de lípidos bioactivos.

Un "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a la parte de un antígeno que reacciona con una parte de unión a antígeno del anticuerpo derivada de un anticuerpo.

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

Un "anticuerpo completamente humano" puede hacer referencia a un anticuerpo producido en un animal modificado por ingeniería genética (es decir, transgénico), por lo general un mamífero, normalmente un ratón (por ejemplo, como se puede obtener de Medarex) que, cuando se presenta con un inmunógeno adecuado puede producir un anticuerpo humano que no requiere necesariamente injerto de CDR. Estos anticuerpos son totalmente "humanos" porque se generan a partir de un animal (por ejemplo, un ratón transgénico) en el que los genes de anticuerpo no humanos se sustituyen o se suprimen y se reemplazan con algunos o todos los genes de inmunoglobulina humana. En otras palabras, los anticuerpos de la invención incluyen los generados frente a lípidos bioactivos, de forma específica LPA, cuando se presentan en una forma inmunogénica a ratones u otros animales modificados genéticamente para producir armazones humanos para las CDR pertinentes.

Un "hapteno" es una sustancia que es no inmunogénica pero que puede reaccionar con un antígeno o parte de unión a antígeno que se obtiene a partir de un anticuerpo. En otras palabras, los haptenos tienen la propiedad de la antigenicidad pero no de la inmunogenicidad. Por lo general un hapteno es una molécula pequeña que puede, en la mayoría de las circunstancias, provocar una respuesta inmunológica (es decir, actuar como un antígeno) solamente cuando se une a un vehículo, por ejemplo, una proteína, polietilenglicol (PEG), oro coloidal, perlas de silicona, o similares. El vehículo puede ser uno que tampoco provoque una respuesta inmunológica por sí mismo.

El término "anticuerpo heteroconjugado" puede hacer referencia a dos anticuerpos unidos de forma covalente. Tales anticuerpos se pueden preparar usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo el uso de agentes de reticulación. Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a moléculas formadas por la unión covalente uno o más fragmento(s) de anticuerpo o restos de unión a una o más molécula(s) de polímero.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima que se obtiene de inmunoglobulina no humana. O, visto de otro modo, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo humano que también contiene secuencias seleccionadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) en lugar de las secuencias humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones conservadoras de aminoácidos o restos no naturales de la misma o diferentes especies que no alteran de forma significativa su actividad de unión y/o biológica. Tales anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que algunos restos de una región que determina la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, camello, bovino, cabra, o conejo que tienen las propiedades deseadas. En algunos casos, la región marco conservada (FR) de restos de inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos.

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y maximizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. Por lo tanto, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá todos los de al menos uno, y en un aspecto dos, dominios variables, en los que todos o todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá

opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), o la de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Cabilly, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Cabilly, *et al.*, documento de Patente Europea n.º 0.125.023 B1; Boss, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.397; Boss, *et al.*, documento de Patente Europea n.º 0.120.694 B1; Neuberger, *et al.*, WO 86/01533; 5 Neuberger, *et al.*, documento de Patente Europea n.º 0.194.276 B1; Winter, documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.225.539; Winter, documento de Patente Europea n.º 0.239.400 B1; Padlan, *et al.*, Solicitud de Patente Europea n.º 0.519.596 A1; Queen, *et al.* (1989), Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, vol. 86: 10029-10033). Para detalles adicionales, véase Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992) y Hansen, documento WO2006105062.

10 La expresión "trastorno hiperproliferativo" se refiere a enfermedades y trastornos asociados con la proliferación incontrolada de células, que incluye, pero no se limita a, crecimiento descontrolado de células de órganos y tejidos dando como resultado cánceres y tumores benignos. Algunos trastornos hiperproliferativos asociados con células 15 endoteliales pueden dar como resultado enfermedades de angiogénesis tales como angiomas, endometriosis, obesidad, degeneración macular relacionada con la edad y diversas retinopatías, así como la proliferación de células endoteliales y células de músculo liso que causan reestenosis como consecuencia de la colocación de endoprótesis vasculares en el tratamiento de aterosclerosis. Algunos trastornos hiperproliferativos que implican fibroblastos (es decir, fibrogénesis) incluyen, pero no se limitan a, trastornos de cicatrización excesiva (es decir, fibrosis) tales como 20 degeneración macular relacionada con la edad, remodelación cardíaca e insuficiencia asociada con infarto de miocardio, así como curación de heridas tal como se produce normalmente como consecuencia de cirugía o lesión, queloides y tumores fibroides y la colocación de endoprótesis vasculares.

25 Un "inmunógeno" es una molécula capaz de inducir una respuesta inmunológica específica, en particular una respuesta a anticuerpo en un animal al que se le ha administrado el inmunógeno. En la presente invención, el inmunógeno es un lípido bioactivo derivatizado conjugado con un vehículo, es decir, un "conjugado de lípido bioactivo derivatizado". El conjugado de lípido bioactivo derivatizado usado como el inmunógeno se puede usar como material de captura para la detección del anticuerpo generado como respuesta al inmunógeno. Por lo tanto, el 30 inmunógeno también se puede usar como un reactivo de detección. Como alternativa, el conjugado de lípido bioactivo derivatizado usado como material de captura puede tener un resto de conector y/o vehículo diferente al del el inmunógeno.

"Inhibir", en particular en el contexto de un fenómeno biológico, se refiere a disminuir, suprimir o retrasar. Por ejemplo, un tratamiento que proporciona "inhibición de la tumorigénesis" puede hacer referencia a que los tumores no se forman en absoluto, o se forman más lentamente, o tienen un número inferior que en los controles sin tratar. 35

Una composición "aislada" es una que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Algunos componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podría interferir con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferentes, la composición es un anticuerpo y se purificará (1) hasta más de un 40 95 % en peso de anticuerpo tal como se determina con el método de Lowry, y más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente 45 del entorno natural del anticuerpo no estará presente. De forma habitual, sin embargo, el anticuerpo aislado se podrá preparar mediante al menos una etapa de purificación.

La expresión "etiqueta" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable, tal como uno que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo. La etiqueta se puede detectar por sí 50 misma (por ejemplo, etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que se puede detectar.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco (tal como los anticuerpos de anti-esfingolípidos que se desvelan en el 55 presente documento y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se colocan normalmente en una formación de bicapa, similar a la colocación de los lípidos de las membranas biológicas. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia normalmente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o configuración en la 60 que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, algunas moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico ya que existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente el anticuerpo en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una posición cromosómica diferente de la de las células no modificadas por ingeniería.

65 En el contexto de la presente invención, una "composición líquida" se refiere una que, en su forma rellena y

acabada, tal como la proporciona un fabricante a un usuario final (por ejemplo, un médico o enfermera), es un líquido o solución, en oposición a un sólido. En el presente documento, "sólido" se refiere a composiciones que no son ni líquidos ni soluciones. Por ejemplo, algunos sólidos incluyen composiciones secas preparadas por liofilización, secado por congelación, precipitación, y procedimientos similares.

La expresión "anticuerpos lineales", cuando se usa en toda la presente solicitud, se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.* Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos de Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

El término "metabolitos" se refiere a compuestos a partir de los que se forman los LPA, así como los que resultan de la degradación de los LPA; es decir, compuestos que están implicadas en las rutas metabólicas lisosomales. La expresión "precursores metabólicos" se puede usar para hacer referencia a compuestos a partir de los que se forman los esfingolípidos.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb), como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, o a dicha población de anticuerpos. Los anticuerpos individuales que comprenden la población son esencialmente idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpo (policlonal) convencionales que por lo general incluye diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención se pueden formar con el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975), o se puede formar mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpo de fago usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), por ejemplo, o con otros métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen de forma específica anticuerpos quiméricos en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos que se obtienen de una especie en particular que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos que se obtienen de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

"Monoterapia" se refiere a un régimen de tratamiento basado en la entrega de un compuesto terapéuticamente eficaz, bien administrado como una sola dosis o varias dosis a lo largo del tiempo.

La expresión "anticuerpo multiespecífico" puede hacer referencia a un anticuerpo, o un anticuerpo monoclonal, que tiene propiedades de unión para al menos dos epítomos diferentes. En una realización, los epítomos son del mismo antígeno. En otra realización, los epítomos son de dos o más antígenos diferentes. En la técnica se conocen algunos métodos para preparar anticuerpos multiespecíficos. Los anticuerpos multiespecíficos incluyen anticuerpos biespecíficos (que tienen propiedades de unión para dos epítomos), anticuerpos trispecíficos (tres epítomos) y así sucesivamente. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos se pueden producir usando de forma recombinante la coexpresión de dos o más pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Como alternativa, los anticuerpos multiespecíficos se pueden preparar usando enlace químico. Un experto puede producir anticuerpos multiespecíficos usando estos u otros métodos como se puede saber en la técnica. Los anticuerpos multiespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos multiespecíficos. Un ejemplo de un anticuerpo multiespecífico (en este caso, biespecífico) comprendido en la presente invención es un anticuerpo que tiene propiedades de unión para un epítomo de S1P y un epítomo de C1P, que de este modo es capaz de reconocer y unirse tanto a S1P como a C1P. Otro ejemplo de un anticuerpo biespecífico comprendido por la presente invención es un anticuerpo que tiene propiedades de unión para un epítomo de un lípido bioactivo y un epítomo de un antígeno de superficie celular. De este modo, el anticuerpo es capaz de reconocer y unirse al lípido bioactivo y es capaz de reconocer y unirse a células, por ejemplo, con fines de dirección.

"Neoplasia" o "cáncer" se refiere a un crecimiento celular anómalo e incontrolado. Una "neoplasia", o tumor o cáncer, es una proliferación del crecimiento celular anómala, desregulada y desorganizada, y por lo general se denomina cáncer. Una neoplasia puede ser benigna o maligna. Una neoplasia es maligna, o cancerosa, si tiene propiedades de crecimiento destructivo, invasividad y metástasis. Invasividad se refiere a la propagación local de una neoplasia por infiltración o destrucción del tejido circundantes, por lo general rompiendo a través de las láminas basales que definen los límites de los tejidos, con lo que a menudo entran en el sistema circulatorio del organismo. Por lo general, metástasis se refiere a la diseminación de células tumorales por los vasos linfáticos o sanguíneos. Metástasis también se refiere a la migración de las células tumorales por extensión directa a través de cavidades

serosas, o subaracnoidea u otros espacios. Durante el proceso de metástasis, la migración de células tumorales a otras zonas del cuerpo establece neoplasias en zonas alejadas del sitio de aparición inicial.

5 El ácido nucleico está "unido de forma operativa" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una líder presecuencia o secretor está unido de forma operativa al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de forma operativa a una secuencia de codificación si influye en la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido de forma operativa a una secuencia de codificación si está colocado de manera que facilita la traducción. Por lo general, "unido de forma operativa" se refiere a que las
10 secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

15 El anticuerpo "precursor" en el presente documento es uno que está codificado por una secuencia de aminoácidos usada para la preparación de la variante. El anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo nativo también puede ser una variante, por ejemplo, un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, el anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

20 Una composición, proceso, máquina, o artículo de fabricación "patentable" de acuerdo con la invención se refiere a que la materia objeto satisface todos los requisitos legales de patentabilidad en el momento en que se realiza el análisis. Por ejemplo, con respecto a novedad, no evidencia, o similares, si la investigación posterior revela que una o más reivindicaciones incluyen una o más realizaciones que pudieran anular la novedad, no evidencia, etc., la(s) reivindicación(es), estando limitada(s) por definición a realizaciones "patentables", excluye(n) de forma específica
25 la(s) realización(es) no patentable.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal, tal como se usa en la formulación, que conserva la eficacia y propiedades biológicas de los agentes y compuestos de la presente invención y que son biológicamente o de otra manera indeseables. En muchos casos, los agentes y compuestos de la presente invención
30 son capaces de formar sales ácidas y/o básicas en virtud de la presencia de grupos cargados, por ejemplo, grupos amino y/o carboxilo cargados o grupos similares a los mismos. Algunas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos, mientras que las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de bases inorgánicas u orgánicas. Para una revisión de sales farmacéuticamente aceptables (véase Berge, *et al*, (1977) J. Pharm Sci, vol 66, 1-19).

35 Una "pluralidad" se refiere a más de uno.

El término "promotor" incluye todas las secuencias capaces de dirigir la transcripción de una secuencia de codificación en una célula. De este modo, los promotores usados en las construcciones de la invención incluyen
40 elementos de control de la transcripción de acción en cis y secuencias reguladoras que están involucradas en la regulación o modulación del tiempo y/o tasa de transcripción de un gen. Por ejemplo, un promotor puede ser un elemento de control de la transcripción de acción en cis, que incluye un potenciador, un promotor, un terminador de la transcripción, un origen de replicación, una secuencia de integración cromosómica, regiones sin traducir en las posiciones 5' y 3', o una secuencia intrónica, que están implicados en la regulación de la transcripción. Algunas
45 regiones reguladoras de la transcripción adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan al potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV), el potenciador/promotor temprano de SV40, los promotores lac o trp de *E. coli*, y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procariontas o eucariotas o sus virus.

50 La expresión "ADN recombinante" se refiere a ácidos nucleicos y productos genéticos expresadas a partir de los mismos que se han modificado por ingeniería, creado, o modificado por el hombre. Los polipéptidos o proteínas "recombinantes" son polipéptidos o proteínas producidos con técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, a partir de células transformadas por una construcción de ADN exógeno que codifica el polipéptido o proteína deseados. Los polipéptidos o proteínas "sintéticos" son los preparados por síntesis química.

55 Los términos "separado", "purificado", "aislado", y similares se refieren a que uno o más componentes de una muestra contenido en un recipiente que alberga muestras se retira no se han retirado físicamente, o diluido en presencia de, uno u otros componentes más de la muestra presentes en el recipiente. Algunos componentes de la muestra que se pueden retirar o diluir durante una etapa de separación o purificación incluyen, productos de
60 reacción química, productos químicos que no han reaccionado, proteínas, carbohidratos, lípidos y moléculas no unidas.

Por "fase sólida" se hace referencia a una matriz no acuosa tal como una a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Algunos ejemplos de fases sólidas incluidas en el presente documento incluyen las formadas
65 parcial o totalmente por vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poli(acrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En determinadas realizaciones, dependiendo del

contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas separadas, tales como las que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.275.149.

5 El término "especie" se usa en el presente documento en diversos contextos, por ejemplo, una especie de agente quimioterapéutico en particular. En cada contexto, el término se refiere a una población de moléculas químicamente indistintas de la clase mencionada en el contexto en particular.

10 El término "específico" o "especificidad" en el contexto de interacciones de anticuerpo-antígeno se refiere a la interacción no aleatoria, selectiva entre un anticuerpo y su epítipo diana. En el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula que es reconocida y se une mediante una molécula de anticuerpo u otro resto derivado del sistema inmunológico. La parte específica de un antígeno que se une mediante un anticuerpo se denomina "epítipo". Esta interacción depende de la presencia de características estructurales, hidrófobas/hidrófilas, y/o electrostáticas que permiten químico interacciones químicas o moleculares apropiadas entre las moléculas. Por lo tanto, normalmente se dice que un anticuerpo se "une" (o "se une de forma específica") o es "reactivo con" (o "específicamente reactivo con"), o, de manera equivalente, "reactivo frente a" (o "específicamente reactivo frente a") el epítipo de su antígeno diana. Normalmente, en la técnica los anticuerpos se describen como los anticuerpos se describen como "frente a" o "para" sus antígenos como forma abreviada a la unión de anticuerpo al antígeno. De este modo, un "un anticuerpo que se une a C1P", un "anticuerpo reactivo frente a C1P", un "anticuerpo reactivo con C1P", un "anticuerpo para C1P" y un "anticuerpo anti-C1P" todos tienen el mismo significado que en la técnica. Algunas moléculas de anticuerpo se pueden someter a ensayo para especificidad de unión mediante comparación de la unión al antígeno deseado con respecto a la unión al antígeno no relacionado o antígeno análogo o mezcla de antígenos bajo un conjunto dado de condiciones. Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención carecerá de una unión significativa a antígenos no relacionados, o incluso análogos del antígeno diana.

25 En el presente documento, "estable" se refiere a una interacción entre dos moléculas (por ejemplo, un péptido y una molécula de TLR) que es lo suficientemente estable de modo que las moléculas se pueden mantener para el fin o manipulación deseados. Por ejemplo, una interacción "estable" entre un péptido y una molécula de TLR se refiere a una en la que el péptido llega a estar y permanece asociado con una molécula de TLR durante un periodo suficiente para lograr el efecto deseado.

30 Un "sujeto" o "paciente" se refiere a un animal con necesidad de tratamiento que se puede realizar con moléculas de la invención. Algunos animales que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen vertebrados, con animales mamíferos tales como bovino, canino, equino, felino, ovino, porcino, y primate (incluyendo seres humanos y primates no humanos) siendo algunos ejemplos particularmente preferentes.

35 Un "marcador sustituto" se refiere a una medición de actividad biológica en laboratorio dentro del organismo que de manera indirecta indica el efecto del tratamiento sobre una patología. Algunos ejemplos de marcadores sustitutos para afecciones hiperproliferativas y/o cardiovasculares incluyen SPHK y/o los S1PR.

40 Un "agente terapéutico" se refiere a un fármaco o compuesto que está destinado a proporcionar un efecto terapéutico que incluye, pero no se limita a: fármacos antiinflamatorios, incluyendo inhibidores de la COX y otros AINE, fármacos antiangiogénicos, fármacos quimioterapéuticos como se ha definido anteriormente, agentes cardiovasculares, agentes inmunomoduladores, agentes que se usan para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, fármacos oftálmicos, etc.

45 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o "cantidad eficaz") se refiere a una cantidad de un principio activo, por ejemplo, un agente de acuerdo con la invención, suficiente para efectuar tratamiento cuando se administra a un sujeto con necesidad de un tratamiento de este tipo. En consecuencia, lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la invención lo puede determinar fácilmente alguien con experiencia habitual en la materia. En el contexto de la terapia para el cáncer, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una que produce un cambio medido de forma objetiva en uno o más parámetros asociados con la supervivencia o metabolismo de células cancerosas, incluyendo un aumento o disminución en la expresión de uno o más genes correlacionados con el cáncer en particular, reducción de la carga tumoral, lisis de células cancerosas, la detección de uno o más marcadores de muerte de células cancerosas en una muestra biológica (por ejemplo, una biopsia y una alícuota de un fluido corporal tal como sangre completa, plasma, suero, orina, etc.), inducción de apoptosis u otras rutas de muerte celular, etc. Por supuesto, la cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y la afección en particular que se están tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la condición de la enfermedad, el compuesto en particular elegido, el régimen de dosificación a seguir, el momento de la administración, la forma de administración y similares, todos los cuales lo puede determinar fácilmente alguien con una experiencia habitual en la materia. Se observará que en el contexto de la terapia de combinación, lo que constituye las de un principio activo en particular puede diferir de lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo cuando se administra como una monoterapia (es decir, un régimen terapéutico que usa solamente una entidad química como el principio activo).

Las composiciones de la invención se usan en métodos de terapia basada en lípidos bioactivos. Como se usa en el presente documento, los términos "terapia" y "terapéutico" incluyen todo el espectro de prevención y/o tratamiento de una enfermedad, trastorno o traumatismo físico. Un agente "terapéutico" de la invención puede actuar de una forma que es profiláctica o preventiva, incluyendo los que incorporan procedimientos diseñados para dirigirse a individuos que se pueden identificar como de riesgo (farmacogenética); o de una manera que sea de naturaleza paliativa o curativa; o pueden actuar para reducir la tasa o alcance de la progresión de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno que se está tratando; o pueden actuar para minimizar el tiempo requerido, la aparición o alcance de cualquier incomodidad o dolor, o limitaciones físicas asociadas con la recuperación de una enfermedad, trastorno o traumatismo físico; o se pueden usar como un adyuvante para otras terapias y tratamientos.

El término "tratamiento" o "que trata" se refiere a cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno, incluyendo prevención o protección frente a la enfermedad o trastorno (es decir, que hace que los síntomas clínicos no se desarrollen); inhibición de la enfermedad o trastorno (es decir, detener, retrasar o suprimir el desarrollo de síntomas clínicos); y/o alivio la enfermedad o trastorno (es decir, causa la regresión de los síntomas clínicos). Como se observará, no siempre es posible distinguir entre "prevenir" y "suprimir" una enfermedad o trastorno debido a que el suceso o sucesos inductores últimos pueden ser desconocidos o latentes. Los individuos "con necesidad de tratamiento" incluyen los que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que el trastorno se va a prevenir. En consecuencia, se entenderá que el término "profilaxis" constituye un tipo de "tratamiento" que incluye tanto "prevención" como "supresión". Por lo tanto, el término "protección" incluye "profilaxis".

El término "régimen terapéutico" se refiere a cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno usando agentes quimioterapéuticos y citotóxicos, terapia de radiación, cirugía, terapia genética, vacunas y terapia de ADN, terapia de ARNs, terapia antiangiogénica, inmunoterapia, trasplantes de médula ósea, aptámeros y otros agentes biológicos tales como anticuerpos y variantes de anticuerpos, señuelos receptores y otros agentes terapéuticos basados en proteínas.

El término región "variable" (de un anticuerpo) comprende regiones marco conservadas y de complementariedad o CDR (conocidas de otro modo como regiones hipervariables) se refiere a ciertas partes de los dominios variables que se diferencian ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular para su antígeno en particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (CDR) tanto en los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan región marco conservada (FR). Cada uno de los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas comprenden cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), que en gran medida adoptan una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina beta. El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos de aminoácidos de una "región que determina la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J. Mol Biol 196: 901-917 (1987)). Los restos de "marco" o "FR" son aquellos restos del dominio variable diferentes a los residuos de la región hipervariable tal como se define en el presente documento.

Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1991), páginas 647-669). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Un "vector" o "plásmido" o "vector de expresión" se refiere a un ácido nucleico que se puede mantener de forma transitoria o estable en una célula para efectuar la expresión de uno o más genes recombinantes. Un vector puede comprender ácido nucleico, solo o formando un complejo con otros compuestos. Un vector comprende opcionalmente ácidos nucleicos y/o proteínas y/o membranas virales o bacterianas. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, replicones (por ejemplo, replicones de ARN, bacteriófagos) a los que se pueden unir algunos fragmentos de ADN y se llegan a replicar. Por lo tanto, los lectores incluyen, pero no se limitan a, ARN, ADN o ARN circular o lineal de autorreplicación autónomo e incluyen los plásmidos tanto de expresión como de no expresión. Los plásmidos pueden estar disponibles en el mercado, disponibles al público en una base no limitada, o se pueden hacer construcciones a partir de plásmidos disponibles tal como se informa con protocolos informados. Además, los vectores de expresión también pueden contener un gen que proporciona un rasgo fenotípico para selección de células hospedadoras transformadas tales como resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para cultivo de células eucariotas, o tal como resistencia a la tetraciclina o a ampicilina en *E. coli*.

Sumario de la invención

La presente solicitud proporciona anticuerpos anti-LPA monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a LPA en condiciones fisiológicas y comprenden al menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (CDR) que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 56, 57, y 58 y un dominio variable de cadena ligera que comprende tres CDR de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 59, 60, y 61. Los anticuerpos anti-LPA pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos malogrados por afinidad, o fragmentos de unión antígeno de cualquier anticuerpo de este tipo. Los anticuerpos anti-LPA se pueden conjugar con un resto seleccionado del grupo que consiste en un polímero, un radionúclido, un agente quimioterapéutico, y un agente de detección y se puede proporcionar en un vehículo, opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, el anticuerpo anti-LPA se puede proporcionar en combinación con un segundo agente que puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un derivado de anticuerpo o una variante de anticuerpo, y que se puede unir a una molécula distinta de LPA. El anticuerpo anti-LPA y el segundo agente se pueden unir, opcionalmente mediante un enlace covalente.

También se desvelan moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una secuencia de identidad definida con secuencias de nucleótidos descritas, que codifican los anticuerpos reivindicados. Las moléculas de ácido nucleico pueden codificar adicionalmente un fragmento de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina o una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina de longitud completa, y se pueden obtener a partir de un pescado, ave o mamífero, opcionalmente un primate, opcionalmente un ser humano. Se desvelan algunos vectores y células hospedadoras que comprenden estas moléculas de ácido nucleico.

Además se describen polipéptidos aislados que comprenden al menos una región marco conservada de una cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina de animal y al menos un péptido de CDR de identidad definida con secuencias proporcionadas. Los polipéptidos pueden dominios variables de longitud completa de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, cadenas pesada o ligera de inmunoglobulina de longitud completa o fragmentos de cadenas pesada o ligera de una inmunoglobulina. De forma específica se desvelan moléculas de anticuerpo aislado, que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina que se unen a LPA en un contexto fisiológico y comprenden al menos una región marco conservada de un dominio variable de una cadena pesada de inmunoglobulina y al menos un péptido de CDR de identidad definida consecuencias proporcionadas, y, asociadas de manera funcional con las dos cadenas pesadas de inmunoglobulina, dos cadenas ligeras de inmunoglobulina que se unen a LPA en un contexto fisiológico y comprenden al menos una región marco conservada de un dominio variable de una cadena ligera de inmunoglobulina y al menos un péptido de CDR de identidad definida con secuencias proporcionadas. Estas moléculas de anticuerpo alistadas pueden ser moléculas de anticuerpo humanizado.

Además, se desvelan moléculas de unión multivalente que comprenden al menos elementos de unión al primer y segundo ligandos, en las que el elemento de unión al primer ligando se une a LPA y comprende al menos un péptido de CDR de identidad definida con secuencias proporcionadas. La molécula de unión multivalente puede ser una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina de longitud completa o un fragmento de la misma. El segundo elemento de unión también se puede unir a LPA y puede tener más de dos elementos de unión a ligando. La molécula de unión multivalente puede comprender un armazón al que se unen los elementos de unión a ligando.

En la presente solicitud también se desvelan cadenas pesadas de anticuerpo anti-LPA aislado con un dominio variable de secuencia definida, así como cadenas ligeras de anticuerpo anti-LPA aislado con un dominio variable de secuencia definida. También se desvela la combinación de dos tales cadenas pesadas y dos de tales cadenas ligeras en un anticuerpo anti-LPA aislado, así como composiciones que contienen un anticuerpo tal como un vehículo que puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona el uso de los anticuerpos de la invención para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con niveles anómalos de LPA, cuyo uso comprende administrar a un sujeto una composición que incluye un anticuerpo anti-LPA, en una cantidad eficaz para reducir la concentración eficaz de LPA. La enfermedad o trastorno puede ser una enfermedad hiperproliferativa, incluyendo cáncer; una enfermedad relacionada con el sistema inmunológico, incluyendo una enfermedad autoinmunitaria, rechazo a aloinjerto y enfermedad de injerto contra hospedador; una enfermedad neurodegenerativa; obesidad; diabetes de tipo 2; una enfermedad ocular, incluyendo degeneración macular; dolor; o una enfermedad asociada con la angiogénesis o neovascularización anómala; apoptosis; fibrogénesis o fibrosis, incluyendo esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cutánea, fibrosis cardíaca y fibrosis hepática; reparación y curación de heridas; o picadura de araña. También se reivindican algunos métodos para disminuir la hiperproliferación anómala, respuesta inmunológica, neurodegeneración, angiogénesis, neovascularización, apoptosis, fibrogénesis o fibrosis en un animal con las composiciones de la invención. La fibrosis a tratar puede ser fibrosis hepática, renal, pulmonar, cardíaco, uterina o cutánea. Puede ser deseable detectar al menos un marcador de fibrosis así como LPA en una muestra del animal, incluyendo un ser humano.

Además se desvelan reactivos de diagnóstico que comprenden un ácido lisofosfatídico derivatizado que comprende

un grupo de cabeza polar y al menos una cadena de hidrocarburo, en el que un átomo de carbono dentro de al menos una de dicha al menos una cadena de hidrocarburo se derivatiza con un grupo reactivo colgante opcionalmente protegido. El grupo reactivo colgante puede ser un grupo sulfhidrilo (tiol), un grupo ácido carboxílico, un grupo ciano, un éster, un grupo hidroxilo, un alqueno, un alquino, un grupo cloruro de ácido o un átomo de halógeno y el ácido lisofosfatídico derivatizado puede estar asociado con un soporte sólido. El ácido lisofosfatídico derivatizado se puede conjugar adicionalmente con un resto de vehículo que es opcionalmente, polietilenglicol, oro coloidal, adyuvante, una perla de sílica o una proteína, y en el que la proteína es opcionalmente hemocianina de lapa californiana, albúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja. Este conjugado se puede unir a un soporte sólido. Se proporcionan algunos métodos para detectar LPA en una muestra, que comprenden la detección de la unión de un anticuerpo anti-LPA de la invención a LPA o un metabolito del mismo en una muestra. La muestra puede ser una muestra biológica incluyendo una muestra de tejido, tal como una muestra de biopsia, y una muestra líquida, que es opcionalmente sangre completa, plasma, suero, orina, semen, bilis, humor acuoso, humor vítreo, fluido de lavado broncoalveolar, mucosa, o esputo. El método de detección puede incluir adicionalmente la detección de al menos un marcador de fibrosis. La detección de LPA también por incluir la comparación de un nivel de LPA en la muestra con un nivel de referencia de LPA para indicar la presencia de enfermedad o para controlar un régimen terapéutico para la modulación de la concentración eficaz de LPA. Además se desvelan kits de ELISA para la detección de LPA.

Los aspectos mencionados anteriormente y otros aspectos de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, figuras adjuntas, y las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

A continuación se proporciona un breve resumen de cada una de las figuras y tablas que se describen en la presente memoria descriptiva, al igual que un listado de diversas secuencias de nucleótidos y aminoácidos que se describen en el presente documento.

Figura 1. Esquema de síntesis orgánica para preparar un análogo de S1P tiolado habitual que se usó como un componente fundamental de un inmunógeno de acuerdo con la invención, así como el componente fundamental del material de depósito para los ensayos de ELISA y BiaCore.

Figura 2. Esquema de síntesis orgánica para preparar el ácido graso relacionado tiolado usado en la síntesis del análogo de LPA tiolado de la Figura 3.

Figura 3. Esquema de síntesis orgánica para preparar el análogo de LPA tiolado que es un componente fundamental de un inmunógeno de acuerdo con la invención, así como un componente fundamental del material de depósito para el ensayo de ELISA y otros ensayos.

Descripción detallada de la invención

A. LPA derivatizado y/o conjugado

1. Composiciones

La presente solicitud desvela LPA que se ha derivatizado de una manera tal como para facilitar la respuesta inmunogénica (es decir, producción de anticuerpos). En una realización, el LPA se puede derivatizar para permitir la conjugación de la molécula de LPA a una molécula vehículo. En una realización, un átomo de carbono dentro de la cadena de hidrocarburo del LPA se derivatiza con un grupo reactivo colgante [por ejemplo, un grupo sulfhidrilo (tiol), un grupo ácido carboxílico, un grupo ciano, un éster, un grupo hidroxilo, un alqueno, un alquino, un grupo cloruro de ácido o un átomo de halógeno] que pueden estar o no protegidos. Esta derivatización sirve para activar el lípido bioactivo para reacción con una molécula, por las, para conjugación con un vehículo. En una realización, el LPA derivatizado es LPA tiolado. En una realización, el LPA derivatizado es LPA C12 o C18 derivatizado. En una realización, el LPA tiolado se conjuga a través de un agente de reticulación, por ejemplo, un agente de reticulación bifuncional tal como IOA o SMCC, a un vehículo, que puede ser una proteína. Puede ser útil conjugar el LPA de este modo a una proteína u otro vehículo que sea inmunogénico en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero (incluyendo albúmina de suero bovino o BSA), tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobenzilo sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R^1 son diferentes grupos alquilo. En la técnica donde se conocen algunos vehículos no proteicos (por ejemplo, oro coloidal) para su uso en producción de anticuerpos.

El LPA derivatizado o derivatizado y conjugado desvelado en el presente documento se puede usar para generar los anticuerpos anti-LPA de la invención. El LPA derivatizado o derivatizado y conjugado también se puede usar en los métodos de diagnóstico de la invención, en particular en métodos de diagnóstico.

2. Investigación y cursos de diagnóstico para LPA derivatizado

Los LPA derivatizados desvelados en el presente documento se pueden usar para detectar y/o purificar anticuerpos anti-LPA y se pueden conjugar con un vehículo como se ha descrito anteriormente. Los derivados y conjugados se conjugan preferentemente a un soporte sólido para su uso en métodos de diagnóstico, incluyendo métodos de diagnóstico clínico. Por ejemplo, la detección y/o cuantificación de anticuerpos de LPA se pueden usar en el diagnóstico de diversas afecciones médicas en las que LPA desempeña un papel. La cuantificación de anticuerpos de LPA también es útil en un entorno clínico para evaluar la dosificación, semivida y niveles farmacológicos después del tratamiento con, por ejemplo, un anticuerpo anti-LPA tal como LT3000 descrito en el presente documento.

En una realización, el conjugado de LPA derivatizado (por ejemplo, LPA tiolado conjugado con BSA o KLH) se usa como material de depósito en los ELISA que se usa en para detectar anticuerpos anti-LPA. En una realización, el LPA es LPA C12 tiolado o LPA C18 tiolado conjugado con BSA. Esta realización es útil, por ejemplo, como material de depósito (para revestir la placa) en ensayos de ELISA para la detección de LPA. Por ejemplo, en un ELISA competitivo para LPA, la placa está revestida con LPA derivatizado y/o derivatizado y conjugado. Un conjunto de uno o más patrones de LPA y una o más muestras (por ejemplo, sobrenadante en suero o cultivo celular) se mezcla con el anticuerpo anti-LPA de ratón de la invención y se añade la placa revestida con LPA derivatizada. El anticuerpo compite por la unión a cualquiera de LPA unido a la placa o LPA en la muestra o patrón. Después de incubación y varias etapas de ELISA, se mide la absorbancia a 450 nm y la concentración de LPA en las muestras se determina por comparación con la curva patrón.

El LPA derivatizado o derivatizado y conjugado también se puede acoplar a un soporte sólido (por ejemplo, resina u otra matriz de columna, perlas, membrana, placa) y se puede usar para aislar y/o purificar anticuerpos anti-LPA, por oscuras, a partir de sangre o suero. Tales anticuerpos anti-LPA pueden ser anticuerpos recién generados tales como los de la invención (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales de mamífero para LPA).

Por lo tanto, el LPA derivatizado y el LPA derivatizado y conjugado desvelados en el presente documento son útiles tanto para investigación como para diagnóstico clínico.

3. Kits de diagnóstico que incorporan el LPA derivatizado de la invención

Como cuestión de conveniencia, los LPA derivatizados desvelados en el presente documento se puede proporcionar en un kit, por ejemplo, una combinación envasada de reactivos en cantidades determinadas previamente con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico.

Como se ha descrito anteriormente, en una realización, el conjugado de LPA derivatizado (por ejemplo, LPA tiolado conjugado con BSA o KLH) se usa como material de depósito (para revestir la placa) en kits para ELISA que se usan para detectar anticuerpos anti-LPA. Los kits de este tipo son útiles para detección del LPA. Por Ejemplo, en un kit para ELISA competitivo de LPA, la placa (proporcionada) se reviste con LPA derivatizado y/o derivatizado y conjugado. Un conjunto de uno o más patrones de LPA (por lo general proporcionados en el kit) y una o más muestras (por ejemplo, sobrenadante en suero o cultivo celular) se mezcla con el anticuerpo anti-LPA de la invención y se añade a la placa revestida con LPA derivatizado. El anticuerpo compite por la unión a cualquiera de LPA unido a la placa o LPA en la muestra o patrón. Después de incubación y varias etapas de ELISA (para los que se proporcionan instrucciones y reactivos en el kit), se mide la absorbancia a 450 nm y la concentración de LPA en las muestras se determina por comparación con la curva patrón. En una realización, el LPA usado para el material de depósito es LPA C12 tiolado o LPA C18 tiolado conjugado con BSA. Un kit que incorpora un Lpath derivatizado y LPA conjugado y un anticuerpo anti-LPA de Lpath, está disponible en el mercado en Echelon Biosciences, Inc., Salt Lake City, UT (Kit de Ensayo Lisofosfatídico, n.º de Cat. K-2800).

B. Anticuerpos anti-LPA

1. Introducción

El uso de anticuerpos monoclonales (mAb) como un tratamiento terapéutico para una diversidad de enfermedades y trastornos está aumentando rápidamente debido a que se ha demostrado que son agentes terapéuticos seguros y eficaces. Algunos anticuerpos monoclonales terapéuticos aprobados incluyen Avastin™, Erbitux™, y Rituxan™. Algunos anticuerpos monoclonales adicionales están en diversas fases de desarrollo clínico para una diversidad de enfermedades con la mayoría dirigiéndose a diversas formas de cáncer. En general, los anticuerpos monoclonales se generan en mamíferos no humanos. La utilidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales de murino se puede mejorar con la quimerización o la humanización de anticuerpos de mamíferos no humanos. La humanización reduce en gran medida el desarrollo de una respuesta inmunológica frente a los anticuerpos monoclonales terapéuticos administrados y de este modo evita la reducción de la semivida y la consiguiente eficacia terapéutica en una respuesta de este tipo. En su mayor parte, el proceso de humanización consiste en injertar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de murino en la región marco conservada (FR) de una inmunoglobulina humana. La retromutación a restos de aminoácidos de murino seleccionados en la FR a menudo se requiere para mejorar o recuperar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial.

La preparación de anticuerpos monoclonales es un proceso complejo que tiene su origen en la variabilidad de la

propia proteína de inmunoglobulina. La heterogeneidad se puede atribuir a la formación de emparejamientos de disulfuro alternativos, desamidación y la formación de restos de isoaspartilo, oxidación de metionina y cisteína, ciclado de restos de glutamina N-terminales para piroglutamato y escisión enzimática parcial de lisinas C-terminales por carboxipeptidasas de mamífero. La modificación por ingeniería se aplica comúnmente a moléculas de anticuerpo para mejorar sus propiedades, tales como aumento de la estabilidad, resistencia a proteasas, comportamiento de agregación y mejora del nivel de expresión en sistemas heterólogos.

2. Asociaciones de enfermedad de LPA y usos terapéuticos para agentes anti-LPA

El LPA se ha asociado con una serie de enfermedades y trastornos. Para una revisión, véase Gardell *et al.*, (2006) Trends Mol Med. 12 (2): 65-75 y Chun J. y Rosen, H., (2006) Curr. Pharma. Design 12: 161-171. Estos incluyen trastornos autoinmunitarios tales como diabetes, esclerosis múltiple y esclerodermia; trastornos hiperproliferativos incluyendo cáncer; trastornos asociados con angiogénesis y neovascularización; obesidad; enfermedades neurodegenerativas incluyendo enfermedad de Alzheimer; esquizofrenia, trastornos relacionados con el sistema inmunológico tales como rechazo a y enfermedad de injerto contra hospedador, y otras.

a. Trastornos hiperproliferativos

Un aspecto de la invención se refiere al uso de los anticuerpos de la invención en métodos para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos. Estos métodos comprenden la administración, a un mamífero (por ejemplo, un animal bovino, canino, equino, ovino, o porcino, en particular un ser humano) del que se sabe o se sospecha que parece un trastorno hiperproliferativo asociado con LPA, de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un agente que interfiere con la concentración y/o actividad de LPA, preferentemente en un vehículo farmacéutico o veterinariamente aceptable, según lo pueda requerir la aplicación prevista. Algunos trastornos hiperproliferativos asociados con LPA incluyen neoplasias, trastornos asociados con proliferación de células endoteliales, y trastornos asociados con fibrogénesis. Muy a menudo, la neoplasia será un cáncer. Algunos trastornos habituales asociados con la proliferación de células endoteliales son trastornos dependientes de la angiogénesis, por ejemplo, cánceres causados por tumores sólidos, tumores hematológicos, y degeneración macular relacionada con la edad. Algunos trastornos asociados con la fibrogénesis incluyen aquellos que implican una remodelación cardíaca anómala, tal como insuficiencia cardíaca.

Existen muchos trastornos hiperproliferativos conocidos, en los que las células de diversos tejidos y órganos presentan patrones anómalos de crecimiento, proliferación, migración, señalización, senescencia, y muerte. Aunque se ha desarrollado una serie de tratamientos para dirigirse a algunas de estas enfermedades, aún quedan muchas en gran parte intratables con las tecnologías existentes, mientras que otros casos, aunque hay disponibilidad de tratamientos, estas son con frecuencia menos que óptimas y rara vez son curativas.

El cáncer quizá representa la clase más ampliamente reconocida de trastornos hiperproliferativos. Los cánceres son una clase de enfermedades devastadoras, y en conjunto, tienen una tasa de mortalidad solamente en un segundo lugar con respecto a la enfermedad cardiovascular. Muchos cánceres no se entienden totalmente en un nivel molecular. Como resultado, el cáncer es un foco importante para programas de investigación y desarrollo tanto para el gobierno de Estados Unidos como para las compañías farmacéuticas. El resultado ha sido un esfuerzo de I + D sin precedentes y la producción de muchos agentes terapéuticos valiosos para ayudar en la lucha contra el cáncer.

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

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

Además, por si fuera poco, los agentes terapéuticos actuales suelen implicar inconvenientes significativos para el paciente en forma de toxicidad y efectos secundarios severos. Por lo tanto, muchos grupos han empezado a buscar nuevos enfoques para luchar en la guerra contra el cáncer. Estas denominadas "terapias innovadoras" nuevas incluyen terapia genética y proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos monoclonales.

El primer anticuerpo monoclonal usado en el entorno clínico para el tratamiento de cáncer fue el Rituxan (rituximab) que fue lanzado en 1997, y ha demostrado la utilidad de los anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos.

Por lo tanto, no de forma sorprendente, desde entonces se han aprobado veinte anticuerpos monoclonales para su uso en entornos clínicos, incluyendo nueve que se prescriben para el cáncer. El éxito de estos productos, así como la reducción del costo y el tiempo para desarrollar anticuerpos monoclonales en comparación con moléculas pequeñas ha convertido a los agentes terapéuticos de anticuerpo monoclonal en la segunda mayor categoría de candidatos a fármacos más allá de las moléculas pequeñas. Además, la excelente especificidad de los anticuerpos en comparación con agentes terapéuticos de molécula pequeña ha demostrado ser una gran ventaja tanto en términos de eficacia como de toxicidad. En la actualidad, solamente para el cáncer de hay más de 270 proyectos bestiales de I + D con anticuerpos con más de 50 empresas que participan en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos de anticuerpo para el cáncer. En consecuencia, los anticuerpos monoclonales están a punto de convertirse en una pieza importante en el tratamiento de cáncer y se calcula que pueden capturar una parte importante del mercado de agentes terapéuticos para el cáncer. Por lo general, los mAb terapéuticos están dirigidos a proteínas; solo recientemente ha sido factible aumentar los mAb para lípidos bioactivos (por ejemplo, anticuerpos para S1P, véase el documento US 20070148168 de los Solicitantes.

La identificación de mediadores extracelulares que estimulan el crecimiento y la supervivencia tumoral es una etapa fundamental en el descubrimiento de intervenciones terapéuticas que reducirán la morbilidad y la mortalidad del cáncer. Como se describe a continuación, se considera que el LPA es un factor de crecimiento tumorigénico, pleiotrópico. El LPA promueve el crecimiento tumoral mediante estimulación de proliferación celular, supervivencia celular, y metástasis. El LPA también estimula la angiogénesis tumoral mediante el apoyo a la migración y supervivencia de células endoteliales a medida que forman nuevos vasos dentro de los tumores. Tomado en conjunto, el LPA inicia una secuencia proliferativa, proangiogénica y antiapoptótica de sucesos que contribuye a la progresión del cáncer. Por lo tanto, las terapias que modulan, y, en particular, reducen los niveles de LPA *in vivo* serán eficaces en el tratamiento del cáncer.

Por lo general, los métodos de la invención para tratamiento o prevención de un trastorno hiperproliferativo tal como el cáncer implican la administración, a un sujeto que padece un trastorno hiperproliferativo, de una cantidad eficaz de cada uno de un agente (o una pluralidad de diferentes especies de agente) de acuerdo con la invención y un agente citotóxico. Algunos agentes citotóxicos incluyen fármacos quimioterapéuticos.

Un aspecto relacionado se refiere a métodos para reducir la toxicidad de un régimen terapéutico para tratamiento o prevención de un trastorno hiperproliferativo. Tales métodos comprenden administrar a un sujeto que padece un trastorno hiperproliferativo una cantidad eficaz de un agente (o una pluralidad de diferentes especies de agente) de acuerdo con la invención antes, durante o después de la administración de un régimen terapéutico destinado a tratar o prevenir el trastorno hiperproliferativo. Se cree que mediante la sensibilización de células, por ejemplo, células cancerosas, a fármacos quimioterapéuticos, se puede conseguir eficacia en dosis más bajas y, por lo tanto, disminuir la toxicidad debida a fármacos quimioterapéuticos.

Además, otro aspecto de la invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención en métodos para mejorar una probabilidad de supervivencia de un sujeto tratado por un trastorno hiperproliferativo mediante la administración, a un sujeto que padece un trastorno hiperproliferativo, un agente (o una pluralidad de diferentes especies de agente) de acuerdo con la invención antes, durante o después de la administración de un régimen terapéutico destinado a tratar o prevenir el trastorno hiperproliferativo para aumentar la probabilidad de supervivencia del sujeto.

3. Fibrosis, curación de heridas y la formación de cicatrices

Los fibroblastos, en particular los miofibroblastos, son elementos celulares fundamentales en la formación de cicatrices como respuesta a lesión celular e inflamación (Tomasek *et al.*, (2002), *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3: 349-63, y Virag y Murry (2003), *Am J Pathol*, vol 163: 2433-40). La expresión genética del colágeno por los miofibroblastos es una evidencia de remodelación y es necesaria para la formación de cicatrices (Sun y Weber (2000), *Cardiovasc Res*, vol 46: 250-6, y Sun y Weber (1996), *J Mol Cell Cardiol*, vol 28: 851-8).

La fibrosis se puede describir como la formación o desarrollo de tejido conectivo fibroso en exceso o anómalo en un órgano o tejido como parte de un proceso reparador o reactivo patológico, al contrario que en la curación o desarrollo de heridas normal. Las formas más comunes de fibrosis son: fibrosis hepática, pulmonar, renal, cutánea, uterina y de ovario. Algunas afecciones, tales como esclerodermia, sarcoidosis y otras, se caracterizan por fibrosis en múltiples órganos y tejidos.

Recientemente, el ácido lisofosfatídico (LPA) lisofosfolípido bioactivo ha sido reconocido por su papel en reparación tisular y curación de heridas. Watterson *et al.*, *Wound Repair Regen.* (2007) 15: 607-16. Como mediador biológico, el LPA ha sido reconocido por su papel en reparación de tejidos y curación de heridas (Watterson, 2007). En particular, el LPA está relacionado con la inflamación pulmonar y renal y con la fibrosis. El LPA es detectable en lavado broncoalveolar humano (BAL) en fluidos en valor inicial y su expresión aumenta durante la inflamación alérgica, Georas, S. N. *et al.* (2007) *Clin Exp Allergy.* (2007) 37: 311-22. Además, el LPA estimula la inflamación en células epiteliales de las vías respiratorias. Barezki, E. *et al* (2006) *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids.* 74: 357-63. Recientemente, las fibrosis pulmonar y renal se han relacionado con el aumento de liberación y señalización de LPA a través del receptor de tipo 1 de LPA (LPA₁). Los niveles de LPA eran elevados en muestras de lavado

broncoalveolar (BAL) de pacientes con IPF y la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones era dependiente de la activación de LPA₁. Tager *et al.*, (2008) Proc Am Thorac Soc. 5: 363. (2008) después de la obstrucción ureteral unilateral en ratones, La fibrosis tubulointerstitial se redujo en ratones con supresión genética de LPA₁ y la expresión de citoquina profibrótica estaba atenuada en ratones de tipo silvestre tratados con un antagonista de LPA₁. J. P. Pradere *et al.*, (2007) J. Am. Soc. Nephrol. 18: 3110-3118. Se ha demostrado que el LPA tiene efectos fibrogénicos directos en fibroblastos cardiacos mediante estimulación de la expresión y proliferación genética de colágeno. Chen, *et al.* (2006) FEBS Lett. 580: 4737-45. Combinados, estos estudios demuestran un papel para LPA en reparación de tejidos y fibrosis, e identifican lípidos bioactivos como una clase previamente no reconocida de dianas en el tratamiento de trastornos fibróticos.

10 a. Esclerodermia

Los anticuerpos de la invención serán útiles para tratar trastornos y enfermedades caracterizados, al menos en parte, por neovascularización, angiogénesis, fibrogénesis, fibrosis, cicatrización, inflamación y respuesta inmunológica anómalas. Una de estas enfermedades es la esclerodermia, que también se conoce como esclerosis sistémica.

La esclerodermia es una enfermedad autoinmunitaria que causa cicatrización o engrosamiento de la piel, y en ocasiones implica a otras zonas del cuerpo, incluyendo los pulmones, corazón y/o riñones. La esclerodermia se caracteriza por la formación de tejido cicatricial (fibrosis) en la piel y órganos del cuerpo, que puede conducir a engrosamiento y firmeza de las zonas implicadas, con la consiguiente reducción en la función. En la actualidad, aproximadamente 300.000 estadounidenses tienen esclerodermia, de acuerdo con la Fundación de Esclerodermia. Un tercio o menos de los afectados tienen una enfermedad generalizada, mientras que los dos tercios restantes tienen principalmente síntomas cutáneos. Cuando la enfermedad afecta a los pulmones y causa formación de cicatrices, la respiración puede llegar a estar limitada debido a que los pulmones ya no pueden expandir como deberían. Para medir la capacidad de respiración, los médicos usan un dispositivo que evalúa la capacidad vital forzada (FVC). En las personas con una FVC inferior a un 50 por ciento de la lectura esperada, la tasa de mortalidad en 10 años por enfermedad pulmonar relacionada con esclerodermia es de aproximadamente un 42 por ciento. Una de las razones por las que la tasa de mortalidad es tan elevada es que en la actualidad no hay un tratamiento eficaz.

Sin desear quedar ligado por ninguna teoría en particular, se cree que las concentraciones inapropiadas de lípidos tales como S1P y/o LPA, y/o sus metabolitos, causan o contribuyen al desarrollo de la esclerodermia. Como tal, las composiciones y métodos de la invención se pueden usar para tratar la esclerodermia, en particular mediante la disminución de la concentración eficaz *in vivo* de un lípido diana particular, por ejemplo, LPA.

La evidencia indica que LPA es un factor de crecimiento profibrótico que puede contribuir a la activación de fibroblastos, proliferación, y el consiguiente aumento de la actividad de los fibroblastos asociado con cicatrización de y remodelación inadaptada. Además, se han demostrado papeles potenciales para LPA en la actividad de los fibroblastos de la piel. Por ejemplo, se ha mostrado que LPA estimula la migración de fibroblastos de piel en murino (Hama *et al.*, J Biol Chem 23 de abril 2004; 279 (17): 17634-9).

45 b. Fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar, a veces denominada enfermedad pulmonar intersticial o ILD, afecta a más de 5 millones de personas en todo el mundo. Dentro de Estados Unidos, parece que la prevalencia de la enfermedad se subestima y varía de 3 a 6 casos por cada 100.000 habitantes a 28 por 100.000. Dentro de Europa, las cifras varían dependiendo de los países, y se han informado aproximadamente de 1 a 24 casos por cada 100.000 sin un claro efecto de género. La enfermedad normalmente se diagnostica entre 40 y 70 años de edad. La supervivencia media es de 3 a 5 años. A pesar de su prevalencia, no hay terapias disponibles para detener o revertir la progresión de la IPF y no hay cursos de tratamiento aprobados por la FDA. Por lo tanto, existe una necesidad sin satisfacer de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de IPF, así como otras enfermedades que implican fibrosis tisular patológica.

La enfermedad pulmonar intersticial, o ILD, incluye más de 180 trastornos pulmonares crónicos, que son crónicos, no maligno y no infecciosos. Las enfermedades pulmonares intersticiales se nombran para el tejido entre los sacos de aire de los pulmones denominado tejido intersticial - el tejido afectado por la fibrosis (cicatrización). Las enfermedades pulmonares intersticiales también se pueden denominar fibrosis pulmonar intersticial o fibrosis pulmonar. Los síntomas y curso de estas enfermedades pueden variar de persona a persona, pero el vínculo común entre las muchas formas de ILD es que todas comienzan con una inflamación, por ejemplo: bronquiolitis - inflamación que afecta a los bronquiolos (vías respiratorias inferiores); alveolitis - inflamación que afecta a los alvéolos (sacos de aire); vasculitis - inflamación que afecta a los vasos sanguíneos pequeños (capilares).

Más de un 80 % de las enfermedades pulmonares intersticiales se diagnostican como neumoconiosis, enfermedad inducida por fármacos, o neumonitis por hipersensibilidad. Los otros tipos son:

65 Exposiciones ocupacionales y ambientales: muchos trabajos, en particular los que implican trabajar con amianto,

suelo de piedra, o polvo de metal, pueden causar fibrosis pulmonar. Las partículas pequeñas se inhalan, dañan los alvéolos, y causan fibrosis. Algunas sustancias orgánicas, tales como heno mohoso también pueden iniciar la fibrosis pulmonar; esto se conoce como pulmón de granjero.

5 La asbestosis se provoca normalmente cuando partículas pequeñas en forma de aguja de asbesto se inhalan en los pulmones. Esto puede causar cicatrización pulmonar (fibrosis pulmonar) y además puede conducir a cáncer de pulmón. El factor fundamental para la asbestosis es la prevención. En la fabricación de productos de amianto, tanto el empleador como el empleado deben ser conscientes de las normas gubernamentales y todos deberían tomar precauciones para evitar la inhalación de las partículas. El peligro principal al trabajar con amianto llega cuando los
10 productos que contienen amianto, friables (desmenuzables), viejos se sustituyen o se destruyen. En esas circunstancias, las partículas se pueden liberar en el aire y respirar en los pulmones. En la actualidad, sin embargo, las fibras de amianto por lo general están "fijadas" por aglutinantes tales como cemento, caucho o plástico, evitando de ese modo que las partículas floten en el aire libre. El hábito de fumar tiene una relación interactiva con el amianto - el trabajador de amianto que fuma tiene una probabilidad mucho más elevada de desarrollar cáncer de pulmón que
15 la que tiene el no fumador.

La silicosis es otra enfermedad que produce fibrosis pulmonar en la que la causa es desconocida. Es una enfermedad que resulta de la inhalación de polvo de sílice cristalina libre. Todos los tipos de minería en los que el mineral se extrae de la roca de cuarzo pueden producir silicosis si no se toman precauciones. Ésta incluye la
20 extracción de oro, plomo, cinc, cobre, hierro, carbón de antracita (duro), y algún carbón bituminoso (blando). Los trabajadores en fundiciones, molienda de piedra arenisca, construcción de túneles, limpieza con chorro de arena, rotura de hormigón, talla de granito, y fabricación de porcelana también se encuentran con sílice.

Las grandes partículas de sílice se detienen en las vías respiratorias superiores. Pero las motas más pequeñas de sílice pueden llegar hasta los alvéolos en los que conducen a fibrosis pulmonar. La silicosis puede ser leve o grave, en proporción directa al porcentaje de concentración de sílice en el aire y la duración de la exposición. La silicosis se puede prevenir con medidas diseñadas de forma específica para cada industria y cada trabajo. El control del polvo es esencial. A veces esto se consigue mediante la humectación de las minas, la mejora de la ventilación, o el uso de
25 mascarillas.

30 Fibrosis pulmonar idiopática: aunque una serie de enfermedades separadas pueden iniciar la fibrosis pulmonar, muchas veces la causa es desconocida. Cuando esto es así, la afección se llama "fibrosis pulmonar idiopática (de origen desconocido)". En la fibrosis pulmonar idiopática, el examen cuidadoso de la historia ambiental y ocupacional del paciente no da pistas para la causa. Algunos médicos y científicos creen que la enfermedad es una afección infecciosa o alérgica, sin embargo algunas bacterias y otros microorganismos no se encuentran habitualmente en los
35 pulmones de estos pacientes. Por otro lado, en ocasiones parece que la afección sigue una enfermedad tipo viral. Por lo tanto, aunque en muchos casos se conoce la causa de la fibrosis pulmonar, la variedad idiopática sigue siendo un misterio.

40 La sarcoidosis es una enfermedad que se caracteriza por la formación de granulomas (zonas de células inflamatorias), que puede atacar a cualquier zona del cuerpo pero con más frecuencia afecta a los pulmones.

Ciertos medicamentos pueden tener el efecto secundario no deseado de causar fibrosis pulmonar; por ejemplo, Nitrofurantoína (en ocasiones se usa para infecciones del tracto urinario); Amiodarona (en ocasiones prescrita para un ritmo cardiaco irregular); Bleomicina, ciclofosfamida, y metotrexato (en ocasiones se prescribe para combatir el
45 cáncer).

La radiación, proporcionada como tratamiento para el cáncer de mama, también puede causar fibrosis pulmonar. Otras enfermedades caracterizadas, al menos en parte, por fibrosis pulmonar incluyen tuberculosis, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, esclerosis sistémica, pulmonar de manipulador de grano, pulmón de trabajador con hongos, bagazosis, pulmón de trabajador con detergentes, pulmón del separador de corteza de arce, pulmón de trabajadores de malta, pulmón de separador de pimentón, pulmón de criador de aves y síndrome de Hermansky Pudlak. La fibrosis pulmonar también se puede heredar genéticamente.
50

55 Características clínicas:

La disnea es la marca distintiva de la fibrosis pulmonar. Muchas enfermedades pulmonares muestran disnea como síntoma principal - un hecho que puede complicar y confundir el diagnóstico. Normalmente la fibrosis pulmonar idiopática con disnea aparece por primera vez durante el ejercicio. La afección puede evolucionar hasta el punto en el
60 que cualquier esfuerzo es imposible. Una tos seca es un síntoma común. Las puntas de los dedos pueden aumentar de tamaño en los extremos y adquieren una apariencia bulbosa. A menudo, esto se denomina "dedos en palillo de tambor".

Algunos síntomas adicionales pueden incluir: dificultad para respirar, especialmente con esfuerzo, fatiga y debilidad, pérdida de apetito, pérdida de peso, tos seca que no produce flema, malestar en el pecho, dificultad para respirar y hemorragia en los pulmones.
65

Diagnóstico

Además de una historia médica y un examen físico completos, las pruebas pueden ser necesarias para mejorar y/o confirmar el diagnóstico de fibrosis pulmonar: pruebas de función pulmonar – para determinar las características y capacidades de los pulmones; espirometría - para medir la cantidad de aire que se puede forzar a salir; medida del flujo máximo - para evaluar los cambios en la respiración y respuesta a medicamentos; análisis de sangre - para analizar la cantidad de las y oxígeno en la sangre; rayos X; escáner de tomografía axial computarizada (TAC); broncoscopia – para examinar el pulmón usando un tubo largo y estrecho denominado broncoscopio; lavado broncoalveolar – para retirar células de las vías respiratorias inferiores para ayudar a identificar la inflamación y excluir ciertas causas; y biopsia de pulmón - para retirar tejido de los pulmones para su análisis en el laboratorio de patología.

Tratamiento

Si existe una de las causas conocidas de la fibrosis pulmonar, entonces el tratamiento de esa enfermedad subyacente o la retirada del paciente del entorno que causa la enfermedad puede ser eficaz. Esto puede incluir tratamiento con: medicamentos orales, incluyendo corticosteroides; vacuna para la gripe; vacuna para neumonía neumocócica, terapia con oxígeno a partir de bombonas portátiles y/o trasplante de pulmón.

Muchas veces el tratamiento se limita solamente a tratar la respuesta inflamatoria que se produce en los pulmones. Esto se realiza con la esperanza de que la detención de la inflamación edite la fijación de tejido cicatricial o fibrosis en los pulmones y de este modo detener la progresión de la enfermedad.

Los corticoides son los fármacos que se administra normalmente en un intento de detener la inflamación. La ventaja de este tratamiento no se ha demostrado en todos los casos, aunque sí parece que si los fármacos se administran desde el principio en el curso de la enfermedad, hay una mejor oportunidad de mejora. Los medicamentos corticosteroides pueden tener diversos efectos secundarios y por lo tanto, algunos pacientes que toman estos medicamentos se deben volver a evaluar con frecuencia por sus médicos para juzgar la seguridad y beneficio de esta terapia.

Se han probado otros fármacos pero faltan evidencias convincentes de su eficacia. Aunque la terapia farmacológica de la fibrosis pulmonar no siempre es satisfactoria, hay mucho que se puede hacer con respecto a la terapia de apoyo que aliviará la dificultad para respirar que acompaña a esta afección. Algunos programas de rehabilitación y educación pueden ayudar de manera considerable a enseñar a los pacientes a respirar de una manera más eficaz y a realizar sus actividades de la vida diaria con menos dificultad para respirar. En ocasiones es necesaria una terapia complementaria con oxígeno para tratar la disnea. Se requiere un tratamiento precoz de las infecciones de pecho. El hábito de fumar se debe interrumpir, ya que los efectos del tabaco agravarán la falta de aliento.

Resultado

Muchas veces la enfermedad es leve con pocos síntomas y no evoluciona de forma significativa con los años. En otros casos, cuando la fibrosis pulmonar se debe a alguna otra enfermedad subyacente tal como artritis reumatoide, la progresión de la afección pulmonar puede reflejar la progresión de las enfermedades subyacentes. En muy raras ocasiones la fibrosis pulmonar tiene un inicio repentino y progresa rápidamente a muerte por insuficiencia respiratoria en un periodo de semanas. Sin embargo, el curso habitual de la fibrosis pulmonar, en particular la fibrosis pulmonar idiopática, es uno de cicatrización progresiva lenta de los pulmones. La duración y velocidad de este proceso es variable. Algunos pacientes responden a la terapia. En otros casos, los pacientes no responden a la terapia y tienen un lento deterioro durante meses o años, terminando finalmente en muerte cuando los pulmones ya no pueden funcionar de manera adecuada.

LPA y fibrosis pulmonar

Aunque la etiología exacta no se conoce, se cree que la IPF es el resultado de una respuesta a la curación de heridas anómala después de una lesión pulmonar. Scotton, C. J. y Chambers, R. C. (2007) *Chest*, 132: 1311-1321. En particular, el aumento de la proliferación y migración de fibroblastos de pulmón, así como la formación de miofibroblastos que producen tejido cicatricial son sucesos fundamentales en la patogénesis de la IPF. Los miofibroblastos son fibroblastos similares a los del músculo liso que expresan actina de músculo liso alfa (α -SMA) y contienen un aparato contráctil formado por filamentos de actina y proteínas asociadas que se organizan en fibras de tensión importante. Además de su papel normal en la homeostasis y reparación tisular, los miofibroblastos son mediadores patológicos en numerosos trastornos fibróticos. Hinz, B. (2007) *J Invest Dermatol*. 127: 526-37. El aumento del número y densidad de miofibroblastos se ha demostrado en los focos fibróticos de modelos animales de fibrosis pulmonar. Los miofibroblastos se forman después de la lesión tisular mediante la cual el aumento de los niveles de factores de crecimiento, citoquinas y estímulos mecánicos estimulan la transformación de fibroblastos del tejido residente en miofibroblastos que producen tejido cicatricial. En el pulmón y otros tejidos, algunos niveles elevados y persistentes de mediadores bioquímicos incluyendo TGF β , CTGF, PDGF y diversas citoquinas

inflamatorias, estimula la formación de miofibroblastos y producción exagerada de tejido cicatricial que conduce a fibrosis tisular (Scotton, 2007). Por lo tanto, algunas estrategias clínicas actuales para el tratamiento de IPF y otros trastornos fibróticos se han dirigido a factores bioquímicos que estimulan la formación de miofibroblastos y la posterior producción de tejido fibroso.

5 Recientemente, el ácido lisofosfatídico lisofosfolípido bioactivo (LPA) ha sido reconocido por su papel en la reparación de tejido y curación de heridas (Watterson, 2007). El LPA es un lisofosfolípido bioactivo (< 500 Dalton) con una sola cadena principal de hidrocarburo y un grupo de cabeza polar que contiene un grupo fosfato. El LPA provoca numerosos efectos celulares a través de la interacción con receptores específicos acoplados a la proteína G (GPCR), denominados EGD2/LPA₁, EDG4/LPA₂, EDG7/LPA₃, y LPA₄. Anliker B. y J. Chun, (2004) *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15: 457-465. Como mediador biológico, el LPA ha sido reconocido por su papel en la reparación de tejidos y curación de heridas (Watterson, 2007). En particular, el LPA está relacionado con la inflamación y la fibrosis pulmonar y renal. El LPA se puede detectar en fluidos de lavado broncoalveolar (BAL) humano en el valor inicial y su expresión aumenta durante la inflamación alérgica (Georas, 2007). Además, el LPA estimula la inflamación en células epiteliales de las vías respiratorias (Barekzi, 2006). Recientemente, la fibrosis pulmonar y renal se ha relacionado con el aumento de liberación y señalización de LPA aún con el receptor de tipo 1 del LPA (LPA₁). Los niveles de LPA eran elevados en muestras de lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes con IPF y la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones era dependiente de la activación de LPA₁ (Tager, 2008). Después de la obstrucción ureteral unilateral en ratones, la fibrosis tubulointerstitial se redujo en ratones con supresión genética de LPA₁ y la expresión de citoquina profibróticas estaba atenuada en ratones de tipo silvestre tratados con un antagonista de LPA₁ (Pradere, 2007). Combinados, estos estudios demuestran un papel para LPA en la reparación tisular y fibrosis, e identifican lípidos bioactivos como una clase previamente no reconocida de dianas en el tratamiento de IPF y otros trastornos fibróticos.

25 c. Fibrosis hepática (hígado)

El hígado posee una notable capacidad de regeneración, por lo tanto, el proceso de reparación mediante regeneración evoluciona a *restitutio ad integrum* completa (restauración completa). Sin embargo, si el daño ha afectado a la estructura reticular, la reparación se producirá mediante formación de cicatrices (fibrosis) que puede conducir a la reordenación de la circulación de la sangre y a cirrosis.

La reacción a la lesión evoluciona como sigue a continuación: Daño (necrosis), acompañado de cambios celulares y cambios tisulares; reacción inflamatoria; y reparación (ya sea por regeneración (*restitutio ad integrum*) o mediante cicatrización (fibrosis).

Algunas enfermedades hepáticas crónicas conducen a fibrosis lo que conduce a una alteración de la arquitectura, hipertensión portal y puede producir un reordenamiento irreversible de la circulación como para causar cirrosis. Existe una fina línea entre fibrosis y cirrosis. La fibrosis no es solamente el resultado de necrosis, colapso y formación de cicatrices, sino también el resultado de alteraciones en la síntesis y degradación de la matriz por las células mesenquimales lesionadas que sintetizan los diversos componentes de la matriz que, en el hígado, son las siguientes categorías: colágenos, glicoproteínas y proteoglicanos.

Evaluación de la Fibrosis Hepática

La evaluación de la Fibrosis Hepática puede ser histológica, por ejemplo, con tinción con tricromo de Masson, tinción con reticulina de plata, anticuerpos específicos para tipos de colágeno, desmina y vimentina para lipocitos, o vimentina para miofibroblastos, o puede ser bioquímica, por ejemplo, mediante: determinación de diversas enzimas en matriz o de laminina sérica en fibrosis benigna.

Clasificaciones de la Fibrosis Hepática

Existen 2 tipos principales, fibrosis hepática congénita y adquirida. La primera es un trastorno genético, que causa enfermedades hepáticas poliquísticas. La última tiene muchas categorías diferentes y está causada principalmente por lesiones de células hepáticas. Patológicamente, la fibrosis se puede clasificar como:

Fibrosis de la zona portal: Hay proliferación de fibroblastos y expansión de fibras de las áreas portales al lóbulo. Por último, estas fibras se conectan para formar separaciones con puentes. Este tipo de fibrosis se observa principalmente en la hepatitis vírica y en la fibrosis hepática por mala nutrición.

Fibrosis intralobular: En el lóbulo normal casi no se encuentran fibroblastos. Cuando grandes números de células hepáticas se degeneran y experimentan necrosis, el marco de la fibra reticular se colapsa y se convierte en fibras de colágeno gruesas. Al mismo tiempo, el tejido fibrótico intra lóbulo prolifera y rodea las células hepáticas.

Fibrosis central: El tejido fibrótico proliferado rodea principalmente la vena central y provoca el engrosamiento de la pared de la vena central.

Fibrosis de conductos perimicrobilares: Tipo de fibrosis causada principalmente por retención de bilis a largo plazo y se produce principalmente alrededor de los conductos biliares. Microscópicamente, hay tejidos conectivos que rodean los canaliculos biliares y tapones de bilis recién formados. La membrana basal de los canaliculos biliares se vuelve fibrótico.

5 Inmunológicamente, la fibrosis hepática se puede clasificar como:

Fibrosis pasiva: Existe una extensa necrosis de las células hepáticas y colapso de la estructura hepática secundaria y formación de cicatrices, que causa proliferación de tejido conectivo.

10 Fibrosis activa: La infiltración de células linfáticas y otras células inflamatorias y la inflamación recurrente y coherente estimula la invasión del lóbulo por parte del tejido conectivo.

15 De forma causal, la fibrosis hepática se puede clasificar como:

20 Fibrosis por hepatitis vírica: Causada normalmente por hepatitis B, C, y D crónica. A nivel mundial, hay trescientos cincuenta millones de vehículos del virus de la hepatitis B, y ciento setenta millones de personas infectadas con hepatitis C. Aproximadamente un 15 % de personas infectadas con VHB y un 85 % de personas infectadas por VHC desarrollará hepatitis crónica y conducirá a fibrosis. En la que el hígado muestra inflamación de la zona periportal y necrosis fragmentada y fibrosis. Con una población tan grande afectada, esta es la categoría más importante de fibrosis hepática.

25 Fibrosis por infección parasitaria: Este tipo de fibrosis hepática se produce principalmente en los países en desarrollo y está causada por la esquistosomiasis. Hay doscientos veinte millones de personas en Asia, África, América del Sur y Central que padecen esta infección. La infección recurrente y los huevos de esquistosoma acumulados en el hígado pueden causar fibrosis hepática y cirrosis.

30 Fibrosis alcohólica: está causada principalmente por el metabolito oxidado de alcohol, acetaldehído. En los países occidentales, la incidencia de este trastorno se relaciona positivamente con la cantidad de consumo de alcohol. El total de casos de fibrosis alcohólica en Estados Unidos es aproximadamente tres veces mayor que el número de hepatitis C. La fibrosis alcohólica causa dos cambios morfológicos en el hígado: hígado graso y deterioro de orgánulos celulares. La fibrosis aparece primero alrededor de las venas centrales y, al mismo tiempo, la inflamación del parénquima hepático. De forma gradual, la fibrosis se extiende a todo el hígado.

35 Fibrosis biliar: Hay fibrosis biliar primaria y secundaria. La fibrosis hepática biliar primaria (PBHF) es un trastorno autoinmunitario en el que la retención de bilis intrahepática crónica causa la fibrosis hepática. A menudo afecta más a las mujeres con edades de aproximadamente 40 a 60 años. En las pruebas de suero, se produce elevación de la globulina gamma y es positivo para anticuerpos antimitocondriales. Algunos estudios patológicos han encontrado que la fibrosis se produce principalmente alrededor de los conductos microbilares y fibrosis e inflamación del área periportal. La fibrosis biliar secundaria se produce después de la obstrucción de los conductos biliares, lo que causa inflamación periportal y fibrosis progresiva.

45 Fibrosis metabólica: Esta categoría no es común y tiene un menor número de casos. La enfermedad de Wilson o degeneración lenticular hepática y la hemocromatosis son los principales trastornos que causan fibrosis metabólica. La primera es un trastorno genético y causa trastornos de metabolismo del cobre y se deposita en el hígado. La última es un trastorno del metabolismo del hierro y causa depósitos de hemoglobina en el hígado. Ambos trastornos metabólicos pueden causar fibrosis hepática y cirrosis.

50 Fibrosis por intoxicación: Cuando se produce un contacto a largo plazo con sustancias tóxicas para el hígado, algunas sustancias tales como tetracloruro de carbono, organofósforo, dimetil nitrosamina, tioacetamida, o se ingieren medicamentos tóxicos para el hígado, tales como isoniacida, pirrolidina tio-oxidante, Wintermin, tetraciclina, acetaminofeno, etc. pueden causar diversos grados de lesiones de células hepáticas, necrosis, retención de bilis, o inflamación alérgica y causar fibrosis hepática.

55 Fibrosis por mala nutrición: Este tipo está causado principalmente por ingesta nutricional insuficiente o desequilibrada. Una dieta a largo plazo con bajo contenido de proteína o alto contenido de grasa puede causar hígado graso y conducir a la fibrosis.

60 Fibrosis cardiogénica: La insuficiencia cardiaca congestiva crónica puede causar estancamiento de la vena hepática de larga duración causando degeneración isquémica de las células hepáticas. En este tipo de fibrosis hepática, la hipertrofia del tejido conectivo se inicia en el centro del lóbulo hepático y gradualmente se extiende al resto del lóbulo.

65 Diagnóstico y Estadificación de la Fibrosis Hepática

El criterio de referencia para evaluar la salud del hígado es la biopsia hepática. Sin embargo, dado que el

procedimiento requiere la inserción de una aguja a través de la piel, hay una posibilidad de complicaciones a pesar de que la incidencia de complicaciones es muy baja. Las complicaciones de una biopsia hepática pueden incluir hemorragia interna, y perforación otro órgano tal como los pulmones, estómago, intestinos, o cualquier otro órgano que esté cerca del hígado. Con respecto a la precisión de la biopsia, el tamaño de la muestra de tejido hepático es importante para la estadificación y clasificación correctas de una biopsia hepática. Otro problema es que el tejido tomado de una parte del hígado puede no ser un 100 % representativa de todo el hígado. Una vez que la muestra de tejido hepático se recoge, se clasifica y estadifica por un especialista (patólogo), lo que podría conducir a posibles errores humanos en la interpretación de los resultados. Además no existe un protocolo de interpretación estandarizado por lo que es difícil comparar los resultados de diferentes biopsias leídos por diferentes patólogos. El precio es también un problema ya que una biopsia hepática típica puede costar entre \$ 1.500 y \$ 2.000.

Teniendo en cuenta estos problemas potenciales, no es sorprendente que haya una gran cantidad de investigación que se está realizando en el desarrollo de pruebas no invasivas. Las pruebas que se han desarrollado hasta el momento han tenido resultados mixtos en la precisión en comparación con los resultados de una biopsia hepática. Se han realizado pocos ensayos clínicos potenciales que hayan comparado los resultados de diversos marcadores no invasivos con los resultados de la biopsia hepática.

Para evaluar de manera objetiva el estadio de fibrosis, la biopsia hepática, en especial una serie de biopsias, es el es el método principal usado en la actualidad. A partir de la biopsia, es posible diagnosticar el grado de inflamación hepática y también el estadio de la fibrosis. El sistema de puntuación más comúnmente usado es el sistema de puntuación de Kanel, que clasifica la fibrosis de 0 a 5. (Al mismo tiempo, el diagnóstico por biopsia también proporciona una clasificación del grado de inflamación, que es de 0 a 4) Estadio 0: normal; Estadio 1: expansión portal con fibrosis (< 1/3 con tratos de manojos de formación de puentes); Estadio 2: fibrosis con formación de puentes; Estadio 3: fibrosis con formación de puentes notable o cirrosis temprana (con fibrosis de tabiques finos); Estadio 4: cirrosis definida con < 50 % de fibrosis por biopsia; Estadio 5: cirrosis definida con > 50 % de fibrosis por biopsia.

Análisis de sangre para diagnosticar la fibrosis hepática: Dado que la biopsia es un procedimiento invasivo, muchos pacientes son cautelosos con la intervención. Los análisis de sangre se están estudiando como un método para evaluar la progresión de la fibrosis. El método de análisis químico de suero usado más comúnmente es por medición de la cantidad de HA (ácido hialurónico), LN (Laminina), CIV (colágeno IV), PCIII (procolágeno de tipo III) en el suero. Se pueden usar como un índice de referencia de actividades de fibrosis. A partir de los análisis de sangre, la relación de AST/ALT se encuentra y cuando es superior a 1, a menudo muestra que el grado de fibrosis está relativamente avanzado. En combinación con si hay un agrandamiento del bazo y disminución del recuento plaquetario y nivel de albúmina, los inventores también pueden calcular el estadio de la fibrosis. En la fibrosis avanzada, el bazo está normalmente agrandado con recuentos propietarios inferiores a 100 y albúmina inferior a 3,5. Con los resultados de los análisis de sangre, la evaluación de la gravedad de la fibrosis es solamente útil para acceder al estadio 0, 1 y 3, 4, y 5. No es capaz de distinguir los estadios entre 2 y 3.

El diagnóstico médico por formación de imágenes B-ultrasónicas, CT, y MRI también se puede usar para evaluar la fibrosis hepática. La imagen B-ultrasónica se usa a menudo para comprobar el tamaño del bazo, medir el diámetro del tallo principal de la vena porta, los diámetros de las ramas de la vena porta derecha e izquierda, el diámetro de la vena en la entrada del bazo, y la velocidad de flujo sanguínea de la vena porta. Se pueden usar endoscopias GI para visualizar si existen varices en el estómago y en el esófago. Éstas se pueden usar como referencia para que hepatólogo evalúe el estadio de la fibrosis.

En general, el término fibrosis se refiere a la formación anómala de tejido fibroso (cicatricial). Para los pacientes con hepatitis, fibrosis se refiere a que el hígado ha estado bajo el ataque de la hepatitis durante algún tiempo. Las primeras etapas de la fibrosis se identifican por zonas localizadas, separadas de cicatrización en una entrada (zona) del hígado. Las etapas posteriores de la fibrosis se identifican por fibrosis "con formación de puentes", que es tejido cicatricial que cruza a través de zonas del hígado. La tasa a la que las personas evolucionan de inflamación a fibrosis, y, por último a cirrosis parece variar enormemente, pero en la mayoría de las personas la evolución es muy lenta. Hay una creciente evidencia de que las personas que responden a la terapia con interferón para infección por VHC pueden experimentar una disminución de la cantidad de cicatrización tisular. Esto habla de la capacidad del hígado para regenerarse por sí mismo. Si la fibrosis avanza lo suficiente, se describe como Cirrosis. La biopsia hepática se realiza para evaluar el grado de inflamación (grado) y grado de cicatrización (estadio). Diagnóstico: Uno de los principales problemas clínicos a los que se enfrenta la comunidad de hepatología y gastroenterología es cómo evaluar y gestionar de la mejor manera el creciente número de pacientes identificados con el virus de la hepatitis C (VHC). En la última década, los avances en ensayos serológicos y virológicos para el VHC y mejoras en la terapia han conducido a una identificación de más pacientes y a la búsqueda de tratamiento. Sin embargo, se ha avanzado poco en la mejora de la capacidad de los inventores para determinar el grado de lesión hepática, en particular fibrosis, o para predecir el riesgo de progresión de la enfermedad para el paciente individual.

El médico se basa en los resultados de la biopsia, tanto para la toma de decisiones terapéuticas y de pronóstico, que pueden tener un impacto importante en la vida del paciente. Una biopsia hepática de una sola etapa es capaz de diagnosticar correctamente el estadio de fibrosis o presencia de cirrosis en un 80 % de los pacientes. Algunos

factores que mejoran la precisión del diagnóstico de biopsia hepática incluyen la presencia de una enfermedad uniforme en todo el hígado tal como VHC, múltiples pases, tipo de aguja usada, y un núcleo de biopsia no fragmentado con una longitud de 2 cm o superior. Incluso con médicos experimentados que realizan la biopsia hepática y algunos patólogos expertos que interpretan la biopsia, el criterio de referencia tiene una tasa de error de hasta un 20 % en la estadificación de la enfermedad.

f. Fibrosis renal (riñón)

El LPA está relacionado con inflamación renal y fibrosis. Recientemente, la fibrosis renal se ha relacionado con un aumento de la liberación y la señalización de LPA a pesar del receptor de tipo 1 de LPA (LAP₁). Después de la obstrucción ureteral unilateral en ratones, la fibrosis tubulointerstitial se redujo en ratones con supresión genética de LAP₁ y la expresión de citoquina profibrótica se atenúa en ratones de tipo silvestre tratados con un antagonista de LAP₁ (Pradere, 2007).

e. Otras fibrosis

Las fibrosis uterinas son tumores no malignos conocidos como leiomiomas uterinos (denominados comúnmente fibromas). Se pueden presentar aislados o crecer en grupos, con tamaños que varían desde el tamaño de una pepita de manzana al tamaño de un pomelo o superior. El diagnóstico de los fibromas uterinos se consigue por lo general mediante ultrasonidos, rayos X, escáner CAT, laparoscopia y/o histeroscopia. El tratamiento de los fibromas uterinos pueden ser médico (tratamiento farmacológico, por ejemplo, con fármacos antiinflamatorios no esteroideos o agonistas de hormona de liberación de gonadotropina) o quirúrgico (por ejemplo, miomectomía, histerectomía, ablación endometrial o miólisis, con desarrollo reciente de métodos menos invasivos tales como embolización del fibroma uterino y ablación térmica con ultrasonidos).

La fibrosis de la piel se puede describir como un engrosamiento o endurecimiento de la piel, y se produce en la esclerodermia y otras enfermedades cutáneas fibróticas. Cuando es grave, la fibrosis puede limitar el movimiento y la función normal. Un queloide es una cicatriz exagerada que se forma como respuesta a un traumatismo, en ocasiones un traumatismo menor tal como perforación de la oreja o acné. A diferencia de la formación de cicatrices normales, los queloides presentan una proliferación desproporcionada de fibroblastos dando como resultado masas de tejido de colágeno. Por lo tanto, la cicatriz sobresale por encima de la superficie de la piel circundante y se infiltra en la piel no estaba traumatizada originalmente. Se han demostrado algunos papeles para el LPA en la actividad de los fibroblastos. Por ejemplo, se ha demostrado que LPA estimula la migración de los fibroblastos de la piel de murino (Hama *et al.*, J Biol Chem 23 de abril 2004; 279 (17): 17634-9). De este modo, se cree que algunos agentes anti-LPA tales como anticuerpos son útiles para el tratamiento de fibrosis cutánea fibrosis anómala tales como queloides o fibrosis cutánea.

Fibrosis cardiaca

También se ha mostrado que el LPA tiene efectos fibrogénicos directos en fibroblastos cardiacos mediante la estimulación de la expresión genética del colágeno y proliferación de fibroblastos. Chen, *et al.*, (2006) FEBS Lett. 580: 4737-45. Por lo tanto, se espera que algunos agentes anti-LPA tales como anticuerpos también tengan efectos anti-fibróticos en las células cardiacas, y de este modo sean eficaces en el tratamiento de la fibrosis cardiaca.

Se cree que algunos agentes que reducen la concentración eficaz de LPA, tales como mAb anti-LPA de Lpath, son útiles en métodos para tratar enfermedades y afecciones caracterizadas por fibrosis anómala.

4. Trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares

Dado que el LPA está implicado en fibrogénesis y curación de heridas de tejido hepático (Davaille *et al.*, J. Biol. Chem. 275: 34268-34633, 2000; Ikeda *et al.*, Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 279: G304-G310, 2000), curación de vasculaturas heridas (Lee *et al.*, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 278: C612-C618, 2000), y otras patologías, o sucesos asociados con enfermedades de este tipo, tales como cáncer, angiogénesis e inflamación (Pyne *et al.*, Biochem. J. 349: 385-402, 2000), las composiciones y métodos de la divulgación se pueden aplicar para tratar no solamente estas enfermedades sino también enfermedades cardiacas así como, en particular las asociadas con remodelación tisular. El LPA tiene ciertos efectos fibrogénicos directos por estimulación de la expresión genética del colágeno y proliferación de fibroblastos cardiacos. Chen, *et al.* (2006) FEBS Lett. 580: 4737-45.

5. Obesidad y diabetes

Se ha encontrado que la autotaxina, una fosfolipasa D responsable de la síntesis del LPA, es secretada por los adipocitos y su expresión está regulada de forma positiva en adipocitos de ratones db/db obesos y diabéticos así como en sujetos que son mujeres masivamente obesas y pacientes humanos con diabetes de tipo 2, independientemente de la obesidad (Ferry *et al.* (2003) JBC 278: 18162-18169; Boucher *et al.* (2005) Diabetologia 48: 569-577, mencionado en Pradere (2007) BBA 1771: 93-102. Se ha mostrado que el LPA por sí mismo influye en la proliferación y la diferenciación de preadipocitos. Pradere *et al.*, 2007. En conjunto con esto sugiere un papel para

los agentes anti-LPA en el tratamiento de obesidad y diabetes.

3. Generación y Caracterización de Anticuerpos

5 Los ejemplos mencionados en lo sucesivo en el presente documento describen la producción de agentes anti-LPA, en particular anticuerpos anti-LPA, con propiedades deseables desde una perspectiva terapéutica que incluye: (a) afinidad de unión hacia el LPA y/o sus variantes, incluyendo LPA 18:2, 18:1, 18:0,16:0, 12:0 y 20:4. Algunas afinidades de anticuerpo se pueden determinar como se describe en los ejemplos que siguen a continuación en el presente documento. Preferentemente los anticuerpos se unen al LPA con una afinidad elevada, por ejemplo, un valor de K_d no superior a aproximadamente 1×10^{-7} M; posiblemente no superior a aproximadamente 1×10^{-8} M; y posiblemente no superior a 5×10^{-9} M. En un contexto fisiológico, para un anticuerpo es preferente que se una al LPA con una afinidad que sea superior a la afinidad del LPA para un receptor de LPA. Se entenderá que esta necesidad no es necesariamente el caso en un contexto no fisiológico tal como un ensayo de diagnóstico.

15 Aparte de los anticuerpos con una fuerte afinidad de unión hacia el LPA, también es deseable seleccionar anticuerpos quiméricos, humanizados o anticuerpos variantes que tengan otras propiedades beneficiosas desde un punto de vista terapéutico. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser uno que reduzca la formación de cicatrices o que altere la progresión del tumor. Un ensayo para determinar la actividad de los anticuerpos anti-LPA de la invención es ELISA. Preferentemente el anticuerpo humanizado o variante fracasa en la provocación de una respuesta inmunogénica después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo a un paciente humano. Si se provoca una respuesta inmunogénica, la respuesta será preferentemente de modo que el anticuerpo aún proporcione un beneficio terapéutico al paciente tratado con el mismo.

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

30 Los anticuerpos de la invención tienen un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula: FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4, en la que "FR1-4" representa las cuatro regiones marco conservadas y "CDRH1-3" representa las tres regiones hipervariables de un dominio pesado variable de anticuerpo anti-LPA. FR1-4 se puede obtener a partir de una secuencia consenso (por ejemplo los aminoácidos más comunes de una clase, subclase o subgrupo de cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas humanas) o se puede obtener a partir de una región marco conservada de anticuerpo humano individual o de una combinación de diferentes secuencias de la región marco conservada. Muchas secuencias de región marco conservada de anticuerpos humanos se recopilan en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente, por ejemplo. En una realización, la FR pesada variable se proporciona por una secuencia consenso de un subgrupo de inmunoglobulina humana tal como se recopila en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.

45 La secuencia de FR pesada variable humana puede tener sustituciones en la misma, por ejemplo en la que el resto de FR humano se sustituye con un resto no humano correspondiente (por "resto no humano correspondiente" se hace referencia al resto no humano con la misma numeración posicional de Kabat que el resto humano de interés cuando las secuencias humanas y no humanas se alinean), pero la sustitución con el resto no humano no es necesaria. Por ejemplo, un resto de FR de sustitución que no sea el resto no humano correspondiente se puede seleccionar mediante presentación de fagos.

50 Los anticuerpos de la realización preferente en el presente documento tienen un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la fórmula: FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4, en la que "FR1-4" representa las cuatro regiones marco conservadas y "CDRL1-3" representa las tres regiones hipervariables de un dominio ligero variable de anticuerpo anti-LPA. FR1-4 se puede obtener a partir de una secuencia consenso (por ejemplo los aminoácidos más comunes de una clase, subclase o subgrupo de cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas humanas) o se puede obtener a partir de una región marco conservada de anticuerpo humano individual o de una combinación de diferentes secuencias de región marco conservada. En una realización preferente, la FR ligera variable se proporciona mediante por secuencia consenso de un subgrupo de inmunoglobulina humana tal como se recopila en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.

60 La secuencia de FR ligera variable humana puede tener sustituciones en la misma, por ejemplo en las que el resto de FR humano se sustituye con un resto de ratón correspondiente, pero la sustitución con el resto no humano no es necesaria. Por ejemplo, un resto de sustitución que no sea el resto no humano correspondiente se puede seleccionar mediante presentación de fagos. Algunos métodos para la generación de anticuerpos anti-LPA humanizados de interés en el presente documento se elaboran con más detalle a continuación.

65 a. Preparación de Anticuerpos

Algunos métodos para generar anticuerpos anti-LPA y variantes de anticuerpos anti-LPA se describen en los Ejemplos que siguen a continuación. Algunos anticuerpos anti-LPA humanizados se pueden preparar basándose en un anticuerpo anti-LPA no humano. Algunos anticuerpos completamente humanos también se pueden preparar, por ejemplo, en un ratón genéticamente modificado (es decir, transgénico) (por ejemplo de Medarex) que, cuando se presenta con un inmunógeno, puede producir un anticuerpo humano que no requiere necesariamente injerto de CDR. Estos anticuerpos son completamente humanos (secuencias de proteínas humanas al 100 %) a partir de animales tales como ratones en los que algunos genes de anticuerpos no humanos se suprimen y se sustituyen con expresión de genes de anticuerpos humanos. Los solicitantes creen que se podrían generar algunos anticuerpos frente a lípidos bioactivos cuando se presentan a estos ratones genéticamente modificados o a otros animales que podrían ser capaces de producir amazones humanos para las CDR relevantes.

Cuando se va a generar una variante, el anticuerpo precursor se prepara.

Algunas técnicas a modo de ejemplo para generar tales anticuerpos no humanos y anticuerpos precursores se describirán en las siguientes secciones.

(i) Preparación de Antígeno

El antígeno que se va a usar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, LPA intacto o una parte de un LPA (por ejemplo un fragmento de LPA que comprende el epítipo). Otras formas de antígenos útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

(ii) Anticuerpos Policlonales

Los anticuerpos policlonales se prepararon preferentemente en animales (vertebrados o invertebrados, incluyendo mamíferos, aves y peces, incluyendo peces cartilaginosos) por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína u otro vehículo que sea inmunogénico en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobenzóil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R^1 son diferentes grupos alquilo. En la técnica también se conocen algunos vehículos no proteicos (por ejemplo, oro coloidal) para producción de anticuerpos.

Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados mediante combinación, por ejemplo, de 100 ug o 5 ug de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con volúmenes tres de adyuvante completo de Freund y mediante inyección de la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con una quinta a una décima parte de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 Días después, se extrae sangre a los animales se sangran y el suero se somete a ensayo para la titulación de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la meseta de titulación. Preferentemente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Algunos conjugados también se pueden preparar en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, algunos agentes de agregación tales como alumbre se usan de forma adecuada para mejorar la respuesta inmunológica.

(iii) Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o se pueden preparar con otros métodos tales como métodos de ADN recombinante (documento de patente de Estados Unidos n.º 4.816,567), En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster como mono macaco, se inmuniza como se ha descrito anteriormente documento para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán de forma específica a la proteína usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma precursoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma unos horas carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas por lo general incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

Algunas células de mieloma preferentes son las que se fusionan de forma eficaz, soportan producción de anticuerpo

- de alto nivel estable por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, algunas líneas celulares de mieloma preferentes son líneas de mieloma murino, tales como las obtenidas a partir de tumores de ratón MOP-21 y M.C.-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California. USA y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos
- 5 Tipo, Rockville, Md. USA. También se han descrito algunas líneas de células de mieloma humano y de heteromioma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al*, Antibody Production Techniques and Applications, pp 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).
- 10 El medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma se somete al ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- 15 La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

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

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

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse de forma específica a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se podría colocar en vectores de expresión, que se conocen bien la técnica, y que a continuación se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá en más detalle a continuación.

40 (iv) Humanización y Variantes de Secuencias de Aminoácidos

Algunos métodos generales para la humanización de anticuerpos se describen en las actualizaciones US5861155, US19960652558 19960606, US6479284, US20000660169 20000912, US6407213, US19930146206 19931117, US6639055, US20000705686 20001102, US6500931, US19950435516 19950504, US5530101, US5585089, US19950477728 19950607, US5693761, US19950474040 19950607, US5693762, US19950487200 19950607, US6180370, US19950484537 19950607, US2003229208, US20030389155 20030313, US5714350, US19950372262 19950113, US6350861, US19970862871 19970523, US5777085, US19950458516 19950517, US5834597, US19960656586 19960531, US5882644, US19960621751 19960322, US5932448, US19910801798 19911129, US6013256, US19970934841 19970922, US6129914, US19950397411 19950301, US6210671, v, US6329511, US19990450520 19991129, US2003166871, US20020078757 20020219, US5225539, US19910782717 19911025, US6548640, US19950452462 19950526, US5624821, y US19950479752 19950607.

50 En determinadas realizaciones, puede ser deseable generar variantes de secuencias de aminoácidos de estos anticuerpos humanizados, en particular cuando éstos mejoran la afinidad de unión u otras propias biológicas del anticuerpo.

55 Algunas variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-LPA se preparan por introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo anti-LPA, o mediante síntesis peptídica. Algunas variantes de este tipo incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-LPA de los ejemplos en el presente documento. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, con la condición de que

60 la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar algunos procesos posteriores a la traducción del anticuerpo anti-LPA humanizado o variante, tales como cambio del número oposición de sitios de glicosilación.

Un método útil para identificar determinados restos o regiones del anticuerpo anti-LPA que son posiciones preferentes para mutagénesis se denominan "mutagénesis de rastreo con alanina", como se describe en Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). En el presente documento, un resto o grupo de restos diana

se identifican (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan con un aminoácido con carga neutra o negativa (lo más preferentemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con antígeno de LPA. Esas posiciones de los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional con respecto a las sustituciones se perfeccionan a continuación mediante introducción de una variante adicional u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, cuando el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos está determinado previamente, no es necesario determinar previamente la naturaleza de la mutación *per se*. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, la mutagénesis de rastreo con alanina o aleatoria se realiza en la región o codón diana y las variantes de anticuerpo anti-LPA expresadas se identifica sistemáticamente para la actividad deseada. Algunas inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales con una longitud que varía de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de un solo resto o múltiples restos de aminoácidos. Algunos ejemplos de inserciones terminales incluyen un resto de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a una etiqueta de epítipo. Otras variantes de inserción incluyen la fusión de una enzima o polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo para el extremo N- o C-terminal del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido retirado de la molécula de anticuerpo y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan algunas alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas son preferentes, pero se pueden introducir más cambios sustanciales y los productos se pueden identificar sistemáticamente. A continuación se enumeran algunos ejemplos de sustituciones:

Sustituciones de Restos de Aminoácidos a modo de Ejemplo

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

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

- (1) Hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) Hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gin, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Algunas sustituciones no conservativas incluirán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo también se puede sustituir, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación anómala. Por el contrario, se pueden añadir enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento de Fv).

Un tipo de variante de sustitución implica la sustitución de uno más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). Por lo general, la variante(s) resultante seleccionada para el desarrollo tendrá propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo precursor a partir del que se generan. Una manera conveniente para generar variantes de sustitución de este tipo es la maduración por afinidad usando visualización de fagos. En resumen, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. A continuación, las variantes que presentan fagos se identifican sistemáticamente para su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar algunos sitios de región hipervariable candidatos para modificación, se puede realizar mutagénesis de rastreo con alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen de forma significativa a la unión del antígeno. Como alternativa, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto ir estos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a la identificación sistemática como se describe en el presente documento y algunos anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para un desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por alteración se hace referencia a delección de uno o más restos de carbohidrato que se encuentran en el anticuerpo, y/o adición de uno más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos por lo general está unida a N y/o unida a O. Unido a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento más comunes para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

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

Algunas moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo antiesfingolípido se preparan con una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de que se produzcan variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural), o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo antiesfingolípido.

(v) Anticuerpos Humanos

Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, en la actualidad es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en ratones mutantes de línea germinal de este tipo dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de estimulación con el antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno, 7:33 (1993); y documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807. Algunos anticuerpos humanos también se pueden obtener a partir de bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); y documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 5.565.332 y 5.573.905). Algunos anticuerpos humanos también se pueden generar mediante linfocitos activados B *in vitro* (véanse los documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 5.567.610 y 5.229.275).

(vi) Fragmentos de Anticuerpo

En ciertas realizaciones, el agente anti-LPA es un fragmento de anticuerpo que retiene al menos una actividad deseada, incluyendo unión al antígeno. Para la producción de fragmentos de anticuerpo se han desarrollado diversas técnicas. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían a través de digestión proteolítica de anticuerpos

intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 24: 107-117 (1992) y Brennan *et al*, Science 229 : 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir en la actualidad directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, algunos fragmentos de Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplada por vía química para formar fragmentos de F(ab')₂ (Carter *et al*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). En otra realización, el F(ab')₂ se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para estimular el ensamblaje de la molécula de F(ab')₂. De acuerdo con otro enfoque, algunos fragmentos de Fv, Fab, F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el médico experto.

10 (vii) Anticuerpos Multiespecíficos y otros Agentes

En algunas realizaciones, el agente anti-LPA comprenderá un primer resto de unión y un segundo resto de unión, en el que el primer resto de unión es específicamente reactivo con una primera molécula que es un LPA o metabolito de LPA y el segundo resto de unión es específicamente reactivo con una segunda molécula que es una especie molecular diferente de la primera molécula. Tales agentes pueden comprender una pluralidad de primeros restos de unión, una pluralidad de segundos restos de unión, o una pluralidad de primeros restos de unión y una pluralidad de segundo sus restos de unión. Preferentemente, la proporción de primeros restos de unión con respecto a segundos restos de unión es aproximadamente 1:1, aunque puede variar de aproximadamente 1000:1 a aproximadamente 1:1000, en la que la relación se mide preferentemente en términos de valencia.

En las realizaciones en las que el primer resto es un anticuerpo, el resto de unión también puede ser un anticuerpo. En realizaciones precedentes, el primero y segundo restos están unidos a través de un resto conector, que puede tener muchos de dos a muchos cientos o incluso miles de valencias para unión del primero y segundo restos de unión mediante una o diferentes clínicas. Algunos ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los que son reactivos frente a dos epítopos diferentes; en alguna realización, un epítipo es un epítipo de LPA y el segundo epítipo es otro lípido bioactivo, por ejemplo, S1P. En otras realizaciones, el anticuerpo biespecífico es reactivo frente a un epítipo en LPA y frente a un epítipo encontrado en la superficie celular. Esto sirve para dirigir el resto de anticuerpo específico para LPA a la célula.

Las composiciones de la invención también pueden comprender un primer agente y un segundo agente, en las que el primer agente comprende un primer resto de unión específicamente reactivo con una primera molécula seleccionada del grupo que consiste en un LPA y un metabolito de LPA y el segundo agente comprende un segundo resto de unión específicamente reactivo con una segunda molécula que es una especie molecular diferente de la primera molécula. El primer y/o segundo agente puede ser un anticuerpo. La proporción de primer a segundo agente puede variar de aproximadamente 1.000:1 a 1:1.000, aunque la proporción referente es aproximadamente 1:1. En realizaciones preferentes, el agente que interfiere con la actividad de LPA es un anticuerpo específicamente reactivo con LPA. En algunas realizaciones, puede ser deseable generar anticuerpos anti-LPA multiespecíficos (por ejemplo biespecíficos) que tengan especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Algunos anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes del LPA. Como alternativa, una rama anti-LPA (del anticuerpo) se puede combinar con una rama que se une a una molécula diferente; por ejemplo, S1P o un antígeno específico de la superficie celular para la localización específica del anticuerpo con respecto a la superficie celular. Algunos anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂).

De acuerdo con otro enfoque para preparar anticuerpos biespecíficos, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo se puede modificar por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La superficie de contacto preferente comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas más grandes laterales (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar ante la cadena(s) lateral grande en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo mediante sustitución de las cadenas laterales de aminoácidos grandes con las más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros. Véase el documento WO96/27011 publicado el 6 de septiembre de 1996.

Algunos anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos "heteroconjugados" o reticulados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Se pueden preparar algunos anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de reticulación conveniente. En la técnica se conocen bien algunos agentes de reticulación adecuados, y se desvelan en el documento de patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

En la bibliografía también se han descrito algunas técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al*, Science 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden por vía proteolítica para generar fragmentos de F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de

formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar ditioles vecinales y para prevenir la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos de Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados de Fab'-TNB se vuelve a convertir en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas. Además, en una realización adicional, los fragmentos de Fab'-SH recuperados directamente de *E. coli* se pueden acoplar por vía química *in vitro* para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J Exp Med 175: 217-225 (1992).

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

Se contemplan algunos anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147: 60 (1991).

30 El anticuerpo (o polímero o polipéptido) de la invención que comprende uno o más sitios de unión por rama o fragmento de la misma se denominará anticuerpo "multivalente" en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo "bivalente" de la invención comprende dos sitios de unión por Fab o fragmento del mismo mientras que un polipéptido "trivalente" de la invención comprende tres sitios de unión por Fab o fragmento del mismo. En un polímero multivalente de la invención, los dos o más sitios de unión por Fab se pueden unir al mismo o diferentes antígenos. Por ejemplo, los dos o más sitios de unión en un polipéptido multivalentes de la invención se puede dirigir frente al mismo antígeno, por ejemplo frente a las mismas partes o epítomos de dicho antígeno o frente a dos o más partes o epítomos iguales o diferentes de dicho antígeno; y/o se pueden dirigir frente a diferentes antígenos; o una combinación de los mismos. Por lo tanto, un polipéptido bivalente de la invención puede comprender por ejemplo dos sitios de unión idénticos, puede comprender un primer sitio de unión dirigido frente a una primera parte o epítopo de un antígeno y un segundo sitio de unión frente a la misma parte o epítopo de dicho antígeno o frente a otra parte o epítopo de dicho antígeno; o puede comprender un primer sitio de unión dirigidos frente a una primera parte o epítopo de un antígeno y un segundo sitio de unión dirigidos frente al antígeno diferente. Sin embargo, tal como será evidente a partir de la descripción mencionada anteriormente en el presente documento, la invención no se limita a esto, en el sentido en el que un polipéptido multivalente de la invención puede comprender cualquier número de sitios de unión dirigidos frente al mismo o diferentes antígenos. En una realización, el polipéptido multivalente comprende al menos dos elementos de unión a ligando, uno de los cuales contiene una o más secuencias peptídicas de CDR mostradas en el presente documento. En otra realización, el polipéptido multivalente comprende tres sitios de unión a ligando, cada uno seleccionado independientemente entre las secuencias de CDR desveladas en el presente documento.

50 Al menos uno de los elementos de unión a ligando se une a LPA. En una realización, al menos uno de los elementos de unión a ligando se une a otra diana. En una realización, hay hasta 10.000 elementos de unión en una molécula de unión multivalente, y los elementos de unión a ligando pueden estar unidos a un armazón.

55 El anticuerpo (o polímero o polipéptido) de la invención que contiene al menos dos sitios de unión por Fab o fragmento del mismo, en el que al menos un sitio de unión se dirige frente a un primer antígeno y un segundo sitio se dirige frente a un segundo antígeno dirigido frente a segundo antígeno diferente del primer antígeno, también se denominará "multiespecífico". Por lo tanto, un polímero "biespecífico" comprende al menos un sitio dirigido frente a un primer antígeno y al menos un segundo sitio dirigido frente a un segundo antígeno, mientras que un polímero "triespecífico" es un polímero que comprende al menos un sitio de unión dirigido frente a un primer antígeno, al menos un sitio de unión adicional dirigido frente a un segundo antígeno, y al menos un sitio de unión adicional dirigidos frente a un tercer antígeno; etcétera. En consecuencia, en su forma más simple, un polipéptido biespecífico de la invención es un polipéptido bivalente (por Fab) de la invención. Sin embargo, tal como será evidente a partir de la descripción mencionada anteriormente en el presente documento, la invención no se limita a esto, en el sentido en el que un polipéptido multiespecífico de la invención puede comprender cualquier número de sitios de unión dirigidos frente a dos o más antígenos diferentes.

(viii) Otras modificaciones

5 Se contemplan otras modificaciones del anticuerpo anti-LPA. Por ejemplo, la invención también se refiere a
 10 inmunocombinados que comprenden el anticuerpo descrito en el presente documento combinado con un agente
 citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal
 o animal o fragmentos de las mismas), o un isótopo radiactivo (por ejemplo, un radioconjugado). Algunos combinados
 se preparan usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de
 N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de
 10 adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como
 glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio
 (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y
 compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno).

15 Los anticuerpos anti-LPA desvelados en el presente documento también se pueden formular como
 inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la
 técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl
 Acad. Sci USA 77: 4030 (1980); y documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 4.485.045 y 4.544.545. Los
 liposomas con mejora del tiempo de circulación se describen en el documento de patente de Estados Unidos n.º
 20 5.013.556. Por ejemplo, algunos liposomas se pueden generar con el método de evaporación en fase inversa con
 una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG
 (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el
 diámetro deseado. Algunos fragmentos de Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los
 liposomas tal como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de
 25 intercambio de disulfuro. Otro principio activo está contenido opcionalmente dentro del liposoma.

Algunas enzimas u otros polipéptidos se pueden unir de forma covalente a los anticuerpos anti-LPA mediante
 técnicas bien conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales
 discutidos anteriormente. Como alternativa, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a
 30 antígeno de un anticuerpo de la invención unidos a al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la
 invención se pueden construir usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por
 ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature 312 : 604-608 (1984)).

En ciertas realizaciones de la invención, puede ser deseable usar un fragmento de anticuerpo, en lugar de un
 35 anticuerpo intacto, para aumentar la penetración de tejidos y células diana, por ejemplo. En este caso, puede ser
 deseable modificar el fragmento de anticuerpo para aumentar su semivida en suero. Esto se puede conseguir, por
 ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor de rescate (por ejemplo, por mutación de la
 región apropiada en el fragmento de anticuerpo o por incorporación del epítipo en una etiqueta peptídica que a
 continuación se fusiona con el fragmento de anticuerpo en cada extremo o en la parte media, por ejemplo, mediante
 40 síntesis de ADN o peptídica). Véase el documento WO96 32478 publicada el 17 de Oct. de 1996.

Dentro del alcance de la presente invención también están incluidas algunas modificaciones covalentes del
 anticuerpo anti-LPA. Se pueden realizar por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si
 fuera aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo
 45 reaccionar restos de aminoácidos dirigidos del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que es capaz de
 reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N- o C-terminales. Algunas modificaciones covalentes
 de polipéptidos a modo de ejemplo se describen en el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.534.615. Un
 tipo de modificación covalente del anticuerpo preferente comprende unión del anticuerpo a uno de una diversidad de
 polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol polioxiálquilenos, en la manera que se
 50 establece en los documentos de patente de de Estados Unidos n.ºs 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417;
 4.791.192 o 4.179.337.

b. Vectores, Células Hospedadoras y Métodos Recombinantes

55 La invención también proporciona ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo anti-LPA, vectores y células
 hospedadoras que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

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

de patente de Estados Unidos n.º 5.534.615 publicado el 9 de julio de 1996.

Algunas células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levadura, eucariotas superiores descritas anteriormente. Algunas células procariotas adecuadas para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacterias tales como *Escherichia*, por Ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por Ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferente es 294 de *E. coli* (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como B de *E. coli*, X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537), y W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Además de procariotas, algunos microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospedador es de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpo anti-esfingolípidos. *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura de panadero común, es la más usada comúnmente entre microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, un número de otros géneros, especies, y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedador es de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Cándida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, hospedadores de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Algunas células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos anti-esfingolípidos glicosilados se tienen a partir de organismos pluricelulares. Algunos ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras de insecto tolerantes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una diversidad de cepas virales para transfección están disponibles al público, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y tales virus se pueden usar como el virus en el presente documento de acuerdo con la invención, el particular para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Como hospedador también se pueden usar algunos cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, tabaco.

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

Las células hospedadoras se transforman con los lectores de expresión o clonación descritos anteriormente para producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados si fuera apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en una diversidad de medios. Algunos medios disponibles en el mercado, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal Biochem. 102: 255 (1980), documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o Re. de Patente de Estados Unidos n.º 30.985 se puede usar como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios se puede complementar si fuera necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las usadas

anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y será evidente para el experto habitual en la materia.

5 Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir por vía intracelular, en el espacio periplásmico, o se puede secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce por vía intracelular, como una primera etapa, los residuos de partículas, ya sea células hospedadoras o fragmentos lisados, se retira, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden retirar por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión por lo general se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon Un inhibidor de proteasa tal como PMSF se puede incluir en cualquiera de las etapas mencionadas anteriormente para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

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

Después de cualquier etapa(s) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo y contaminantes de interés se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH aproximadamente entre 2,5-4,5, realizada preferentemente a concentraciones de sal bajas (por ejemplo, con sal a aproximadamente 0-0,25 M).

c. Formulaciones farmacéuticas, dosificación y vías de administración

40 La presente invención proporciona anticuerpos anti-LPA y composiciones y métodos relacionados para reducir los niveles en sangre y tejido del lípido bioactivo, LPA.

Se dice que los métodos y composiciones terapéuticos de la invención "se basan en LPA" para indicar que estas terapias pueden cambiar la concentración(s) relativa, absoluta o eficaz de lípidos no deseables o tóxicos. Algunos "lípidos no deseables" incluyen lípidos bioactivos tóxicos, así como metabolitos, en particular precursores metabólicos, de lípidos tóxicos. Un ejemplo de un lípido bioactivo no deseable de interés en particular es el LPA.

Una forma de controlar la cantidad de LPA no deseable en un paciente es proporcionando una composición que comprende uno o más anticuerpos anti-LPA para unirse a uno o más LPA, actuando de ese modo como "esponjas" terapéuticas que reducen el nivel de LPA no deseable libre. Cuando se dice que un compuesto está "libre", el compuesto no está limitado en modo alguno al sitio o sitios en los que ejerce sus efectos no deseables. Por lo general, un compuesto libre está presente en sangre y tejido, que es o que contiene el sitio(s) de acción del compuesto libre, o desde el que un compuesto puede migrar libremente a su sitio(s) de acción. Un compuesto libre también puede estar disponible para su actuación mediante cualquier enzima que convierta el compuesto en un compuesto no deseable.

Los anticuerpos anti-LPA se pueden formular en una composición farmacéutica que es útil para una diversidad de fines, incluyendo el tratamiento de enfermedades, trastornos o traumatismo físico. Las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos anti-LPA de la invención se pueden incorporar en kits y dispositivos médicos para tal tratamiento. Los dispositivos médicos se pueden usar para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención a un paciente con necesidad de las mismas, y de acuerdo con una realización de la invención, se proporcionan kits que incluyen tales dispositivos. Tales dispositivos y kits se pueden diseñar para administración de rutina, incluyendo autoadministración de las composiciones farmacéuticas de la invención. Tales dispositivos y kits también se pueden diseñar para uso de emergencia, por ejemplo, en ambulancias o salas de emergencia, o durante la cirugía, o en actividades donde es posible una lesión pero en las que toda la atención médica puede estar inmediatamente disponible (por ejemplo, senderismo y acampada, o situaciones de combate).

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Pharmaceutical Sciences de Remington, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Algunos vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes de quelación tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o agentes tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo si fuera necesario para la indicación que se está tratando en particular, preferentemente las que tienen actividades complementarias que no afectan de manera adversa entre sí. Tales moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

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

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

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

Para el uso en aplicaciones terapéuticas, los agentes anti-LPA, por ejemplo, los anticuerpos de la invención se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable, tal como las que se han discutido anteriormente, incluyendo las que se pueden administrar a un ser humano por vía intravenosa tal como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, o a través de las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación.

Para el uso en prevención o tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 .mu.g/kg a aproximadamente 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpos una dosificación candidata inicial para administración al paciente, ya sea,

por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria o semanal habitual podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 20 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o un periodo el tiempo superior, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales, incluyendo, por ejemplo, formación de imágenes radiográficas. Algunos métodos de detección que usan el anticuerpo para determinar niveles de LPA en fluidos o tejidos corporales se pueden usar para optimizar la exposición del paciente al anticuerpo terapéutico.

De acuerdo con otra realización de la invención, la composición que comprende un anticuerpo, por ejemplo, un mAb, que interfiere con la actividad de LPA se administra como una monoterapia, mientras que en otras realizaciones preferentes, la composición que comprende el anticuerpo que interfiere con la actividad de LPA se administra como parte de una terapia de combinación. En algunos casos, la eficacia del anticuerpo en la prevención o tratamiento de la enfermedad se pueden mejorar mediante la administración del anticuerpo en serie o en combinación con otro agente que es eficaz para esos fines, tal como un fármaco quimioterapéutico para el tratamiento de cáncer. En otros casos, el agente anti-LPA puede servir para mejorar o sensibilizar las células con respecto a un tratamiento quimioterapéutico, permitiendo de ese modo eficacia a dosis más bajas y con menor toxicidad. Algunas terapias de combinación preferentes incluyen, además de la administración de la composición que comprende un agente que interfiere con la actividad de LPA, la administración de un segundo régimen terapéutico seleccionado del grupo que administración de un agente quimioterapéutico, terapia de radiación, cirugía, y una combinación de cualquiera de los mencionados anteriormente. Tales otros agentes pueden estar presentes en la composición que se está administrando o se puede administrar por separado. Además, el anticuerpo se administra de forma adecuada en serie o en combinación con el otro agente o modalidad, por ejemplo, fármaco quimioterapéutico o radiación para el tratamiento del cáncer.

d. Investigación y diagnóstico, incluyendo diagnóstico clínico, usos para los anticuerpos anti-LPA de la invención

Los anticuerpos anti-LPA de la invención se pueden usar para detectar y/o purificar LPA, por ejemplo, a partir de fluido(s) corporal(es).

Para el uso de anticuerpos anti-LPA como agentes de purificación por afinidad, los anticuerpos se inmovilizan sobre un soporte sólido tal como perlas, una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el LPA a purificar, y a partir de ese momento el soporte se lava con un disolvente adecuado que retirará de forma sustancial todo el material en la muestra excepto el LPA, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Por último, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, por ejemplo entre pH 3 y pH 5,0, que liberará el LPA del anticuerpo.

Algunos anticuerpos anti-LPA también pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico para LPA, por ejemplo, detectando su presencia en células, tejidos o fluidos corporales específicos. Tales métodos de diagnóstico pueden ser útiles en el diagnóstico, por ejemplo, de una enfermedad o trastorno hiperproliferativos. Por lo tanto, algunos usos de diagnóstico clínico así como usos de investigación están comprendidos en la invención. En estos métodos, el anticuerpo anti-LPA se une preferentemente a un soporte sólido, por ejemplo, perla, columna, placa, gel, filtro, membrana, etc.

Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo se puede etiquetar con un resto detectable. Por lo general, están disponibles numerosas etiquetas que se pueden agrupar en las siguientes categorías:

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

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

(c) Diversas etiquetas de sustrato enzimático están disponibles y el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de estas. Por lo general, la enzima cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir por vía espectrofotométrica. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Algunas técnicas para cuantificar un cambio de la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se llega a excitar electrónicamente mediante una reacción química y a continuación puede emitir luz que se puede medir (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o cede energía a un aceptor fluorescente. Algunos ejemplos de etiquetas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; documento de

Patente de Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), heterociclicoxidasas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Algunas técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone y H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73: 147-166 (1981).

Algunos ejemplos de combinaciones de sustrato enzimático incluyen, por ejemplo:

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

Otras numerosas combinaciones de sustrato enzimático están disponibles para los expertos en la materia. Para una revisión general de éstos, véase los documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 4.275.149 y 4.318.980.

En ocasiones, la etiqueta se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El experto en la materia entre información sobre diversas técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de etiquetas mencionadas anteriormente se pueden conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se une de forma selectiva a la avidina y de este modo, la etiqueta se puede conjugar con el anticuerpo de esta manera indirecta. Como alternativa, para conseguir la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de etiquetas mencionadas anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, se puede conseguir la conjugación indirecta de la etiqueta con el anticuerpo.

En otra realización de la invención, no es necesario etiquetar el anticuerpo anti-LPA, y la presencia del mismo se puede detectar, por ejemplo, usando un anticuerpo etiquetado que se une al anticuerpo anti-LPA.

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

Algunos ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón etiquetado para competir con el analito de la muestra de ensayo para unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de LPA en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos por lo general son insolubles antes o después de la competición, de modo que el analito y el patrón que se unen a los anticuerpos se pueden separar de manera conveniente del patrón y analito que permanecen sin unir.

Los ensayos de sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectar. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une mediante un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido, y a partir de ese momento un segundo anticuerpo se une al analito, formando de ese modo un complejo insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos n.º 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar etiquetado por sí mismo con un resto detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está etiquetado con un resto detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo de ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

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

Los anticuerpos también se pueden usar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Por lo general, el anticuerpo está etiquetado con un radionúclido (tal como ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ¹²⁵I, ³H, ³²P, o ³⁵S) de modo que la molécula diana unida se puede localizar usando inmunocentelleografía.

e. Kits de diagnóstico que incorporan los anticuerpos anti-LPA de la invención

Como cuestión de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención se puede proporcionar en un kit, por ejemplo, una combinación de reactivos empaquetados en cantidades determinadas previamente con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está etiquetado con una enzima, el kit incluye sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un sustrato precursor que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón

de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que de forma sustancial optimizan la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, normalmente liofilizados, incluyendo excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo con la concentración apropiada.

f. Artículos de Fabricación

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

La invención se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos, que pretenden ilustrar simplemente el mejor modo ahora conocido para poner en práctica la invención. El alcance de la invención no debe ser considerado limitado a estos.

Ejemplos

La invención se describirá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos detallados.

EJEMPLO 1: Esquema de síntesis para preparar un análogo tiolado representativo de S1P

El enfoque de síntesis que se describe en este ejemplo da como resultado la preparación de un antígeno mediante adición en serie de elementos estructurales usando principalmente química orgánica convencional. Un esquema para el enfoque que se describe en este ejemplo se proporciona en la **Figura 1**, y los números del compuesto en la descripción de síntesis que sigue a continuación se refieren a las estructuras numeradas en la **Figura 1**.

Este enfoque de síntesis comienza con el 15-hidroxi pentadecino disponible en el mercado, **1**, y activación con cloruro de metil sulfonilo del grupo 15-hidroxi para facilitar la sustitución de hidroxilo para producir el sulfonato, **2**. La sustitución del sulfonato con t-butilo tiol proporcionó el tioéter protegido, **3**, que se condensó con aldehído de Garner para producir **4**. La reducción con cuidado del resto de alquino a un alqueno (**5**), seguido de apertura del anillo de oxazolideno catalizada con ácido proporcionó la esfingosina sustituida con tiol con S protegido y con N protegido, **6**. Durante esta última etapa, se usó una nueva derivación con dicarbonato de di-t-butilo para mitigar la pérdida del grupo N-BOC durante la apertura del anillo catalizada con ácido.

Como se observará, el compuesto **6** se puede usar por sí mismo como un antígeno para preparar haptenos para producir anticuerpos para esfingosina, o, como alternativa, como material de partida para dos enfoques de síntesis diferentes para preparar un análogo de S1P tiolado. En un enfoque, la fosforilación del compuesto **6** con fosfato de trimetilo produjo el compuesto **7**. El tratamiento del compuesto **7** con bromuro de trimetilsililo retiró ambos grupos metilo del grupo fosfato y del grupo t-butiloxicarbonilo de la amina primaria, dejando el compuesto **8** con el grupo t-butilo en el azufre como el único grupo protector. Para retirar este grupo, el grupo t-butilo se desplazó con NBS para formar el disulfuro, **9**, que a continuación se redujo para formar el análogo de S1P tiolado, **10**.

Otro enfoque implicaba el tratamiento del compuesto **6** directamente con NBSCI para formar el disulfuro, **11**, que a continuación se redujo para formar el análogo de S1P tiolado N-prottegido, **12**. El tratamiento de este compuesto con ácido suave proporcionó el análogo de esfingosina tiolado, **13**, que se puede fosforilar por vía enzimática con, por ejemplo, esfingosina quinasa, para producir el análogo de S1P tiolado, **10**.

Algunas modificaciones del enfoque de síntesis presentado son posibles, en particular con respecto a la selección de reactivos de protección y desprotección, por ejemplo, el uso de triflato de disulfuro de trimetilo descrito en el Ejemplo 3 para desproteger el tiol.

Compuesto 2. DCM (400 ml) se añadió a un matraz RB de 500 ml cargado con **1** (10,3 g, 45,89 mmol), y la solución resultante se enfrió a 0 °C. A continuación, se añadió TEA (8,34 g, 82,60 mmol, 9,5 ml) todo de una vez seguido de MsCl (7,88 g, 68,84 mmol, 5,3 ml) añadido otra aorta durante 10 min. La reacción se dejó en agitación a TA durante 0,5 h o hasta la desaparición del material de partida ($R_f = 0,65$, hexanos: EtOAc a 5:1). La reacción se interrumpió con NH_4Cl (300 ml) y se extrajo (2 x 200 ml) DCM. Las fases orgánicas se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y el

filtrado se evaporó hasta un sólido (13,86 g, rendimiento de un 99,8 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ 4,20 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,98 (s, 3H), 2,59 (td, J = 7 Hz, 3 Hz, 2H), 1,917 (t, J = 3 Hz, 1H), 1,72 (quintuplete, J = 7,5 Hz, 2H), 1,505 (quintuplete, J = 7,5 Hz, 2H), 1,37 (s a, 4H), 1,27 (s a, 14H). RMN ¹³C {¹H} (CDCl₃) δ 85,45, 70,90, 68,72, 46,69, 38,04, 30,22, 30,15, 30,14, 30,07, 29,81, 29,76, 29,69, 29,42, 29,17, 26,09, 19,06, 9,31. El principal ión observado en un análisis de HRMS (ES-TOF) del compuesto **2** fue m/z = 325,1804 (calculado para C₁₆H₃₀O₃S: M + Na⁺ 325,1808).

Compuesto 3. Un matraz RB de 1 l de tres bocas se cargó con *t*-butilliol (4,54 g, 50,40 mmol) y THF (200 ml) y a continuación se colocó en un baño de hielo. Se añadió *n*-BuLi (31,5 ml de 1,6 M en hexanos) durante 30 min. A continuación, el compuesto **2** (13,86 g, 45,82 mmol), disuelto en THF (100 ml), se añadió durante 2 min. La reacción se deja en agitación durante 1 hora o hasta que el material de partida desaparece (R_f = 0,7, 1:1 de hexanos/EtOAc). La reacción se interrumpió con NH₄Cl saturado (500 ml) y se extrajo con EtO₂ (2 x 250 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el filtrado se evaporó para producir un aceite de color amarillo (11,67 g, rendimiento de un 86 %). RMN ¹H (CDCl₃) δ 2,52 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,18 (td, J = 7 Hz, 2,5 Hz, 2H), 1,93 (t, J = 2,5 Hz, 1H), 1,55 (quintuplete, J = 7,5 Hz, 2H), 1,51 (quintuplete, J = 7 Hz, 2H), 1,38 (s a, 4H), 1,33 (s, 9H), 1,26 (s, 14H). RMN ¹³C {¹H} (CDCl₃) δ 85,42, 68,71, 68,67, 54,07, 42,37, 31,68, 30,58, 30,28, 30,26, 30,19, 30,17, 29,98, 29,78, 29,44, 29,19, 29,02, 19,08.

Compuesto 4. Un matraz Schlenk de 250 ml cargado con el compuesto **3** (5,0 g, 16,85 mmol) se evacuó y se relleno con nitrógeno tres veces antes de añadir THF seco (150 ml). La solución resultante se enfrió a -78 °C. A continuación, se añadió *n*-BuLi (10,5 ml de 1,6 M en hexanos) durante 2 min. y la mezcla de reacción se agitó durante 18 min. a -78 °C antes de retirar el baño de refrigeración durante 20 min. Se volvió al baño de hielo seco. Después de 15 min, se añadió a continuación aldehído de Garner (3,36 g, 14,65 mmol) en THF seco (10 ml) durante 5 min. Después de 20 min, el baño de refrigeración se retiró. La cromatografía en capa fina (TLC) después de 2,7 h. mostraba que ya no había aldehído de Garner. La reacción se interrumpió con NH₄Cl acuoso saturado (300 ml) y se extrajo con Et₂O (2 x 250 ml). Las fases de Et₂O combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y el filtrado se evaporó para dar el compuesto **4** en bruto y su diastereómero sin (no se muestra en la **Figura 1**) en forma de un aceite de color amarillo (9,06 g). Este material se usó a continuación en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Compuesto 5. Para reducir el triple enlace en el compuesto **4**, el aceite se disolvió en Et₂O seco (100 ml) en atmósfera de nitrógeno. RED-Al (20 ml, 65 % en tolueno) se añadió lentamente a la solución resultante a TA para controlar la evolución del gas hidrógeno (H₂). La reacción se dejó en agitación a TA durante una noche o cuando TLC mostraba la desaparición del material de partida (R_f = 0,6 en 1:1 de EtOAc : hexanos) y se interrumpió lentamente con MeOH frío o NH₄Cl acuoso para controlar la evolución del H₂. La suspensión de color blanco resultante se filtró a través de una capa de Celite y el filtrado se extrajo con EtOAc (2 x 400 ml). Los extractos de EtOAc combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron, y el filtrado se evaporaron para dejar el compuesto **5** en bruto y su diastereómero sin (no se muestra en la **Figura 1**) en forma de un aceite de color amarillo (7,59 g).

Compuesto 6. El aceite que contenía el compuesto **5** se disolvió en MeOH (200 ml), se añadió hidrato de PTSA (0,63 g), y la solución se agitó a TA durante 1 día y a continuación a 50 °C durante 2 días, punto en el que TLC sugería que todo el material de partida (**5**) había desaparecido. Sin embargo, estaba presente una cierta cantidad de material polar, lo que sugiere que el ácido había escindido parcialmente el grupo BOC. La reacción se trató mediante la adición de NH₄Cl acuoso saturado (400 ml), y se extrajo con éter (3 x 300 ml). Las fases de éter combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y el filtrado se evaporó a sequedad, dejando 5,14 g de aceite. Para volver a proteger cualquier amina que se hubiera formado, el producto en bruto se disolvió en CH₂Cl₂ (150 ml), a la que se añadieron BOC₂O (2,44 g) y TEA (1,7 g). Cuando TLC (1:1 de hexanos/EtOAc) no mostraba material restante en el valor inicial, se añadió NH₄Cl acuoso saturado (200 ml), y, después de separar la fase orgánica, la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 200 ml). Los extractos combinados se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y el filtrado se concentró a sequedad para producir un aceite de color amarillo (7,7 g) que se cromatografió en una columna de sílice usando un gradiente de hexanos/EtOAc (hasta 1:1) para separar los diastereómeros. Con TLC usando PE/EtOAc a 1:1, el R_f para el isómero anti, compuesto **6**, era 0,45. Para el isómero sin (no se muestra en la **Figura 1**) el R_f era 0,40. El rendimiento del compuesto **6** fue 2,45 g (39 % global basándose en el aldehído de Garner). RMN ¹H del isómero anti (CDCl₃) δ 1,26 (s a, 20H), 1,32 (s, 9H), 1,45 (s, 9H), 1,56 (quintuplete, 2H, J = 8 Hz), 2,06 (c, 2H, J = 7 Hz), 2,52 (t, 2H, J = 7 Hz), 2,55 (s a, 2H), 3,60 (s a, 1H), 3,72 (ddd, 1H, J = 11,5 Hz, 7,0 Hz, 3,5 Hz), 3,94 (dt, 1H, J = 11,5 Hz, 3,5 Hz), 4,32 (d, 1H, J = 4,5 Hz), 5,28 (s a, 1H), 5,54 (dd, 1H, J = 15,5 Hz, 6,5 Hz), 5,78 (dt, 1H, J = 15,5 Hz, 6,5 Hz). RMN ¹³C {¹H} (CDCl₃) δ 156,95, 134,80, 129,66, 80,47, 75,46, 63,33, 56,17, 42,44, 32,98, 31,70, 30,58, 30,32, 30,31, 30,28, 30,20, 30,16, 30,00, 29,89, 29,80, 29,08, 29,03.

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

Compuesto 7. A una solución de del compuesto de alcohol **6** (609,5 mg, 1,25 mmol) disuelto en piridina seca (2 ml) se añadió CBr₄ (647,2 mg, 1,95 mmol, 1,56 equiv.). El matraz se enfrió en un baño de hielo y se añadió P(OMe)₃ (284,7 mg, 2,29 mmol, 1,84 equiv.) gota a gota durante 2 min. Después de 4 min. El baño de hielo se retiró y después de 12 h. La mezcla se diluyó con éter (20 ml). La mezcla resultante se lavó con HCl acuoso (10 ml, 2 N) para formar una emulsión que se separó mediante dilución con agua (20 ml). La fase acuosa se extrajo con éter (2 x 10 ml), y a continuación con EtOAc (2 x 10 ml). Los extractos de éter y el primer extracto de EtOAc se combinaron y se lavaron con HCl acuoso (10 ml, 2 N), agua (10 ml), y NaHCO₃ acuoso saturado (10 ml). El último extracto EtOAc se usó para volver a extraer los lavados acuosos. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre

MgSO₄, se filtraron, y el filtrado se concentró para dejar un producto en bruto (1,16 g), que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre sílice (columna de 3 x 22 cm) usando CH₂Cl₂, y a continuación CH₂Cl₂-EtOAc (1:20, 1:6, 1:3, y 1:1 - el producto comienza a eluir, 6:4, 7:3). Las fracciones iniciales contenían 56,9 mg de aceite. Las últimas fracciones proporcionaron el producto (compuesto **7**, 476,6 mg, 64 %) en forma de un aceite claro e incoloro.

5

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

Compuesto 8. El matraz que contenía el compuesto **7** (333,0 mg, 0,559 mmol) y una barra de agitación se evacuó y se cargó con nitrógeno. Se inyectó acetonitrilo (4 ml, destilado a partir de CaH₂) mediante una jeringa y el matraz que ahora contiene una solución se enfrió en un baño de hielo. Usando una jeringa, se añadió (CH₃)₃SiBr (438,7 mg, 2,87 mmol, 5,13 equiv.) durante el transcurso de 1 min. Después de 35 min, la parte superior del matraz se aclaró con una porción adicional de acetonitrilo (1 ml) y el baño de hielo se retiró. Después de otros 80 min, se retiró una alícuota, la solución se secó soplando casi nitrógeno sobre la misma, y el residuo se analizó por RMN ¹H en CDCl₃, que presentaba solamente trazas de picos atribuidos a restos de P-OCH₃. Después de 20 min, se añadió agua (0,2 ml) a la mezcla de reacción, seguido de la solución de CDCl₃ usada para analizar la alícuota, y la mezcla se concentró a un volumen de aproximadamente 0,5 ml en un rotavapor. Usando acetona (3 ml) en porciones, el residuo se transfirió a un tubo de ensayo tarado, forman una solución de color marrón pálido. Se añadió por (3 ml) en porciones. Después de la adición de 0,3 ml, se observó turbidez. Después de un total de 1 ml, se había formado un precipitado gomoso. A medida que se añade una cantidad adicional de 0,6 ml de agua, se observa más turbidez y se separa goma, pero la porción final de agua no parecía cambiar el aspecto de la mezcla. En global, este proceso se consiguió durante un periodo de varias horas. El tubo se centrifugó y el sobrenadante se retiró con pipeta. El sonido, que ya no es gomoso, se secó sobre P₄O₁₀ al vacío, dejando el compuesto **8** (258,2 mg, 95 %) en forma de un monohidrato.

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

Compuesto 9. El compuesto **8** (202,6 mg, 0,417 mmol) se añadió en una caja de guantes a un tubo de ensayo que contenía una barra de agitación, se añadieron THF seco (3 ml) y HOAc glacial (3 ml), NBSCl (90 mg, 0,475 mmol, 1,14 equiv.), y después de 0,5 h., se obtuvo una solución transparente. Después de un período total de 9 h., una alícuota se evaporó a sequedad y el residuo se analizó por RMN ¹H en CDCl₃. Los picos correspondientes a CH₂StBu y CH₂SSAr sugerían que la reacción era completa en aproximadamente un 75 %, y la comparación del espectro con el de NBSCl puro en CDCl₃ sugería que no había permanecido nada del reactivo en la reacción. Por lo tanto, se añadió una porción adicional (24,7 mg, 0,130 mmol, 0,31 equiv.), seguido 3 h. más tarde por una porción adicional (19,5 mg, 0,103 mmol, 0,25 equiv.). Después de otro periodo de 1 h., la mezcla se transfirió a un nuevo tubo de ensayo usando THF (2 ml) para aclarar y se añadió agua (1 ml).

Compuesto 10. PMe₃ (82,4 mg, 1,08 mmol, 1,52 veces la cantidad total de cloruro de 2-nitrobenzenosulfenilo añadido) se añadió a la solución transparente del compuesto **9** descrito anteriormente. La mezcla creció caliente y turbia, con formación de precipitado con el tiempo. Después de 4,5 h., se añadió metanol, y el tubo se centrifugó. El precipitado sedimentó con dificultad, ocupando la parte inferior de 1 cm del tubo. El sobrenadante de color amarillo claro se retiró usando una pipeta. Se añadió metanol (5 ml, desoxigenado con nitrógeno), el tubo se centrifugó, y el sobrenadante se retiró con la pipeta. Este ciclo se repitió tres veces. Cuando se concentró, el lavado final con metanol dejó solamente 4,4 mg de residuo. El residuo sólido en volumen se secó sobre P₄O₁₀ al vacío, dejando el compuesto **10** (118,2 mg, 68 %) en forma de un monoclorhidrato.

Anal. Calculado para C₁₈H₃₈NO₅S + HCl (417,03): C, 51,84; H, 9,43; N, 3,36. Encontrado: C, 52,11; H, 9,12; N, 3,30.

Compuesto 11. El compuesto **6** (1,45 g, 2,97 mmol) se disolvió en AcOH (20 ml), y NBSCl (0,56 g, 2,97 mmol) se añadió todo de una vez. Se permitió que la reacción estuviera en agitación durante 3 h. o hasta la desaparición del material de partida y la aparición del producto se observó por TLC [R_f del producto = 0,65, R_f del material de partida = 0,45, 1:1 de EtOAc/hexanos]. La reacción se concentró a sequedad en una línea de alto vacío y el residuo se disolvió en THF/H₂O (100 ml de 10:1).

Compuesto 12. Se añadió Ph₃P (0,2,33 g, 8,91 mmol) todo de una vez a la solución mencionada anteriormente que contenía el compuesto **11** y la reacción se dejó en agitación durante 3 h. o hasta que el material de partida desapareciera. La mezcla de reacción en bruto se concentró a sequedad en una línea de alto vacío, dejando un residuo que contenía el compuesto **12**.

Compuesto 13. El residuo mencionado anteriormente que contenía el compuesto **12** se disolvió en DCM (50 ml) y TFA (10 ml). La mezcla se agitó a TA durante 5 h. y se concentró a sequedad. El residuo se cargó en una columna con gel de sílice y se cromatografió con DCM puro, seguido de DCM que contenía MeOH al 5 %, a continuación MeOH al 10 %, para producir el producto final, compuesto **13**, en forma de un sólido de color blanco pegajoso (0,45 g, 46 % de rendimiento de **5**). RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,27 (s), 1,33 (m a.), 1,61 (p, 2H, J = 7,5 Hz), 2,03 (d a, 2H, J = 7 Hz), 2,53 (c, 2H, J = 7,5 Hz), 3,34 (s a, 1H), 3,87 (d a, 2H, J = 12 Hz), 4,48 (s a, 2H), 4,58 (s a, 2H), 5,42 (dd, 1H, J = 15 Hz, 5,5 Hz), 5,82 (dt, 1H, J = 15 Hz, 5,5 Hz), 7,91 (s a, 4H). RMN ¹³C {¹H} (CDCl₃) δ 136,85, 126,26,

57,08, 34,76, 32,95, 30,40, 30,36, 30,34, 30,25, 30,19, 30,05, 29,80, 29,62, 29,09, 25,34.

EJEMPLO 2: Esquemas de síntesis para preparar ácidos grasos tiolados

5 El enfoque de síntesis descrito en este ejemplo detalla la preparación de un ácido graso tiolado a incorporar en una estructura lipídica más compleja que podría formar complejos adicionalmente con una proteína u otro vehículo y se administra a un animal para provocar una respuesta inmunológica. Este enfoque usa química orgánica convencional. Un esquema que muestra al enfoque tomado en este ejemplo se proporciona en la **Figura 2**, y los números del compuesto en la descripción de síntesis que sigue a continuación se refieren a las estructuras numeradas en la **Figura 2**.

15 Se describen dos síntesis. La primera síntesis, para un ácido graso tiolado C-12, comienza con el ácido 12-dodecanoico disponible en el mercado, compuesto **14**. A continuación, el bromo se desplaza con t-butilo tiol para producir el ácido graso tiolado C-12 protegido, compuesto **15**. La segunda síntesis, para un ácido graso tiolado C-18, comienza con el 9-bromo-nonanol disponible en el mercado (compuesto **16**). El grupo hidroxilo en el compuesto **16** se protege mediante la adición de un grupo dihidropirano y el compuesto resultante, **17**, se dimeriza a través de activación de la mitad del material bromado a través de la reacción de Grignard, seguido de la adición de la otra mitad. El 18-hidroxi octadecanol (compuesto **18**) producido siguiendo la retirada catalizada por ácidos del grupo protector de dihidropirano se mono-broma de forma selectiva para formar el compuesto **19**. Durante esta reacción aproximadamente la mitad de los grupos alcohol se activan para sustitución nucleófila mediante formación de un éster del ácido metano sulfónico. A coordinación con el alcohol se oxida para formar el ácido 18-bromocarboxílico, compuesto **20**, que a continuación se trata con t-butilo tiol para desplazar el bromo y forma el ácido graso C-18 tiolados, protegido, compuesto **21**.

25 Los ácidos grasos tiolados protegidos, cada uno un t-butilo tióéter, se pueden incorporar en un lípido complejo y el grupo protector se puede retirar usando, por ejemplo, uno de los enfoques de desprotección que se describen en los Ejemplos 1 y 3. A continuación, el tiol libre resultante se puede usar para formar complejos con una proteína u otro vehículo antes de inocular el animal con el hapteno.

A. Síntesis de un ácido graso tiolado C-12

35 **Compuesto 15.** Se añadió t-butilo tiol (12,93 g, 143 mmol) a un matraz Schlenk seco, y se usaron métodos de Schlenk para poner el sistema en atmósfera de nitrógeno. Se añadió THF desgasificado, seco (250 ml) y el matraz se enfrió en un baño de hielo. Se añadió *n*-BuLi (55 ml de 2,5 M en hexanos, 137,5 mmol) lentamente durante 10 min mediante una jeringa. La mezcla se dejó en agitación a 0 °C durante una hora. El bromoácido, compuesto **14** (10 g, 36 mmol), se añadió en forma de un sólido y la reacción se calentó y se agitó a 60 °C durante 24 h. La reacción se interrumpió con HCl 2 M (250 ml), y se extrajo con éter (2 x 300 ml). Las fases de éter combinadas se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron, y el filtrado se concentró por evaporación rotatoria para producir el tióéter ácido, compuesto **15** (10 g, rendimiento de un 99 %) en forma de un polvo de color beige. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 1,25-1,35 (s a, 12 H), 1,32 (s, 9 H), 1,35-1,40 (m, 2 H), 1,50-1,60 (m, 2H), 1,60-1,65 (m, 2 H), 2,35 (t, 2 H, J = 7,5 Hz), 2,52 (t, 2 H, J = 7,5 Hz). El ión principal en HRMS (ES-TOF) se observó a m/z 311,2020, calculado para M + Na⁺ 311,2015.

B. Síntesis de un ácido graso tiolado C-12

45 **Compuesto 17.** Una matraz Schlenk seco se cargó con el compuesto **16** (50 g, 224,2 mmol) y se disolvió en THF desgasificado seco (250 ml) destilado a partir de sodio/benzofenona. El matraz se enfrió en un baño de hielo y a continuación se añadió PTSA (0,5 g, 2,6 mmol). A continuación, se añadió DHP desgasificado seco (36 g, 42,8 mmol) lentamente durante 5 min. La mezcla se dejó calentar hasta TA y se dejó en agitación durante una noche y se controló por TLC (PE: EtOAc a 10:1) hasta que se consideró que la reacción estaba realizada por la completa desaparición de la aplicación puntual para el bromoalcohol. A continuación se añadió TEA (1 g, 10 mmol) para interrumpir el PTSA. Después, la mezcla se lavó con solución fría de bicarbonato sódico y se extrajo con EtOAc (3 x 250 ml). Las fases orgánicas se secaron a continuación con sulfato de magnesio y se concentraron para producir 68,2 g del producto en bruto que se purificó por cromatografía en columna (PE: EtOAc a 10:1) para producir 60 g (rendimiento de un 99 %) en forma de un aceite incoloro. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 1,31 (s a, 6H), 1,41-1,44 (m, 2 H), 1,51-1,62 (multipletes desconocidos, 6 H), 1,69-1,74 (m, 1 H), 1,855 (quintuplete, J = 7,6 Hz, 2 H), 3,41 (t, J = 7 Hz, 2 H), 3,48-3,52 (m, 2 H), 3,73 (dt, 2 H, J = 6,5 Hz), 3,85-3,90 (m, 2 H), 4,57 (t, 2 H, J = 3 Hz).

60 **Compuesto 18.** Se añadieron limaduras de magnesio (2,98 g, 125 mmol) a un matraz Schlenk secado a la llama junto con un cristal de yodo. El THF seco (200 ml) destilado a partir de sodio se añadió a continuación y el sistema se desgasificó usando técnicas de Schlenk. A continuación, el compuesto **17** (30 g, 97 mmol) se añadió lentamente al magnesio durante 10 min. y la solución se puso en un baño de aceite a 65 °C y se dejó en agitación durante una noche. La reacción se consideró completa por TLC mediante inactivación de una alícuota con acetona y observando el cambio en RF en una mezcla de PE:EtOAc a 10:1. A continuación, la solución de Grignard se transfirió con cánula a un matraz de tres bocas en atmósfera de nitrógeno que contenía el compuesto **17** adicional (30 g, 97 mmol). El matraz que contenía la mezcla resultante se enfrió a continuación a 0 °C en un baño de hielo y a continuación se

añadió una solución de Li_2CuCl_4 (3 ml de 1 M) mediante una jeringa. La mezcla de reacción se volvió de un color azul muy oscuro en unos pocos minutos. Esta mezcla se dejó en agitación durante una noche. A la mañana siguiente, la reacción se consideró completa por TLC (PE:EtOAc a 10:1), ser inactivo con una solución de NH_4Cl saturado, y después se extrajo en éter (3 x 250 ml). Las fases de éter se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron para producir el producto en bruto (40 g), que se disolvió en MeOH. A continuación, se añadió HCl concentrado (0,5 ml), que dio como resultado la formación de una emulsión de color blanco, que se dejó en agitación durante 3 h. La emulsión de color blanco se filtró a continuación para producir 16 g (rendimiento de un 58 %) del diol puro, compuesto **18**. RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1,26 (s a, 24 H), 1,41-1,42 (m, 4 H), 1,51-1,68 (m, 4 H), 3,65 (t, 4 H, $J = 6,5$ Hz).

Compuesto 19. El diol simétrico, compuesto **18** (11 g, 38,5 mmol), se añadió a un matraz Schlenk seco en atmósfera de nitrógeno, a continuación se añadió THF seco (700 ml) destilado a partir de sodio. El sistema se desgasificó y el matase puso en un baño de hielo. Se añadió diisopropiletilamina (6,82 ml, 42,3 mmol) mediante una jeringa, seguido de MsCl (3,96 g, 34,4 mmol) añadido lentamente, y la mezcla se dejó en agitación durante 1 h. La reacción se interrumpió con solución saturada de NaH_2PO_4 (300 ml), y a continuación se extrajo con EtOAc (3 x 300 ml). Las fases orgánicas se combinaron a continuación, se secaron con MgSO_4 , y se concentraron para producir 14 g de una mezcla del diol, monomesilato, y dimesilato. RMN mostró una mezcla a 1:0,8 de protones de CH_2OH : CH_2OMs . A continuación, la mezcla se disolvió en THF seco (500 ml), se desoxigenó, y a ésta se le añadió LiBr (3,5 g, 40,23 mmol). Se permitió que esta mezcla estuviera a reflujo durante una noche, tras lo cual la reacción se interrumpió con agua (150 ml), y se extrajo con EtOAc (3 x 250 ml). La fase orgánica seco a continuación con MgSO_4 , y se concentró para producir una mezcla de productos bromados que a continuación se purificaron por cromatografía ultrarrápida (DCM) para producir el compuesto **19** (3,1 g, rendimiento de un 25 %) en forma de un polvo de color blanco. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1,26 (s a, 26 H), 1,38-1,46 (m, 2 H), 1,55 (quintuplete, 2 H, $J = 7,5$ Hz), 1,85 (quintuplete, 2 H, $J = 7,5$ Hz), 3,403 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz), 3,66 (t, 2 H, $J = 6,8$ Hz).

Compuesto 20. Un matraz de fondo redondo se cargó con el compuesto **19** (2,01 g, 5,73 mmol) y el sólido se disolvió en acetona de calidad reactiva (150 ml). De forma simultánea, se preparó reactivo de Jones por disolución de CrO_3 (2,25 g, 22 mmol) en H_2SO_4 (4 ml) y a continuación se añadieron lentamente 10 ml de agua fría y se dejó que la solución se agitara durante 10 min. El reactivo de Jones frío se añadió a continuación al matraz de fondo redondo lentamente durante 5 min, tras lo cual la solución se agitó durante 1 h. La solución de color naranja resultante se volvió de color verde en varios minutos. A continuación, la mezcla se inactivó con agua (150 ml) se extrajo dos veces en éter (3 x 150 ml). Las fases de éter se secaron a continuación con sulfato de magnesio, y se concentraron para producir el compuesto **20** (2,08 g, rendimiento de un 98 %) en forma de un polvo de color blanco. RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1,27 (s a, 26 H), 1,58-1,71 (m, 2 H), 1,77-1,97 (m, 2H), 2,36 (t, 2 H, $J = 7,4$ Hz), 3,42 (t, 2 H, $J = 7$ Hz).

Compuesto 21. Se añadió t-butilliol (11,32 g, 125 mmol) a una tras Schlenk seco y se disolvió en THF seco (450 ml) destilado a partir de sodio. La solución se desoxigenó por burbujeo de nitrógeno a través del mismo antes de colocar el matraz en un baño de hielo. A continuación, la solución de *n*-BuLi en hexanos (70 ml de 1,6 M) se añadió lentamente mediante una jeringa durante 10 min. Esta mezcla se dejó en agitación durante 1 h., la combinación el compuesto **20** (5,5 g, 16,2 mmol) se añadió y la solución se dejó a reflujo a 60 °C durante una noche. Ta la mañana siguiente, una alícuota se trató, se analizó por RMN, y la reacción se consideró completa. La reacción se interrumpió con HCl (200 ml de 2 M) y se extrajo con éter (3 x 250 ml). A continuación, las fases de éter se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron, y el filtrado se concentró para producir el producto, compuesto **21**, en forma de un sólido de color blanco (5 g, rendimiento de un 90 %). RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1,26 (s a, 26 H), 1,32 (s a, 9 H), 1,48-1,70 (m, 4 H), 2,35 (t, 2 H, $J = 7,3$ Hz), 2,52 (t, 2 H, $J = 7,3$ Hz). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 200 MHz) δ 24,69, 28,35, 29,05, 29,21, 29,28, 29,39, 29,55, 29,89, 31,02 (3 C), 33,98, 41,75, 179,60.

EJEMPLO 3 Esquema de síntesis para preparar un análogo tiolado de LPA

El enfoque de síntesis que se describe en este ejemplo da como resultado la preparación de LPA tiolado. A continuación, el análogo de LPA puede formar complejos adicionalmente con un vehículo, por ejemplo, un vehículo de proteína, que a continuación se debe administrar a un animal para provocar una respuesta inmunogénica a LPA. Este enfoque usa tanto química orgánica como reacciones en climáticas, cuyo esquema de síntesis se proporciona en la **Figura 3**. Los números del compuesto en la descripción de la síntesis que sigue a continuación se refieren a las estructuras numeradas en la **Figura 3**.

Los materiales de partida eran el compuesto **15** en el Ejemplo 2 y glicerofosfocolina enantioméricamente pura (compuesto **22**). Estos dos compuestos químicos se combinaron para producir el producto diacetilado, compuesto **23**, usando DCC para facilitar la esterificación. En una variante del proceso de síntesis, la glicerofosfocolina diacilada resultante se trató primero con fosfolipasa-A2 para retirar el ácido graso en la posición sn-2 de la cadena principal de glicerol para producir el compuesto **24**. Esta sustancia se trató adicionalmente con otra enzima, fosfolipasa-D, para retirar la colina y formar el compuesto **26**. En otra variante del proceso de síntesis, el tratamiento con fosfolipasa-D iba precedido del tratamiento con fosfolipasa-A2 para producir el compuesto **25**, y el tratamiento del compuesto **25** con fosfolipasa-D proporciona a continuación el compuesto **26**. Ambas variantes conducen al mismo producto, el derivado del ácido fosfatídico, compuesto **26**. El grupo protector de t-butilo en el compuesto **26** se retira a

continuación, primero usando triflato de disulfuro de trimetilo para producir el compuesto **27**, seguido de una reducción de disulfuro para producir el derivado de LPA deseado, compuesto **28**. Como observarán los expertos en la materia, la secuencia de reacción de nitrobenil sulfenilo descrita en el Ejemplo 1 también se puede usar para producir el compuesto **28**.

5 **Compuesto 23.** A un matraz Schlenk secado a la llama se añadieron el tioéter ácido, compuesto **15** (10 g, 35,8 mmol), compuesto **22** (complejo glicerofosfocolina-CdCl₂, 4,25 g, 8,9 mmol), DCC (7,32 g, 35,8 mmol), y DMAP (2,18 g, 17,8 mmol), tras lo cual el matraz se evacuó y se llenó con nitrógeno. Se añadió una cantidad mínima de DCM desgasificado, seco (100 ml), dando como resultado una mezcla estadia. El matraz se cubrió con papel de aluminio y a continuación se exponen agitación hasta que la reacción se completó, tal como se muestra por TLC (sílice, DCM: MeOH: NH₄OH concentrado a 10:5:1). La insolubilidad del compuesto **16** descartaba el control de su desaparición por TLC, pero la reacción se detuvo cuando se consideró que la intensidad de aplicación puntual del producto de R_f 0,1 no aumentaba. Por lo general con esto requiere de 3 a 4 días, y en algunos casos, la adición de más DCC y DMAP. Después de la finalización, la mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se concentró para producir un aceite de color amarillo, que se purificó usando cromatografía ultrarrápida usando el sistema de disolvente descrito anteriormente para producir 3,6 g (rendimiento de un 50 %) de una acera transparente que contenía una mezcla del compuesto **23** y productos monoacilados en una proporción de 5 a 1, tal como se calcula a partir de la comparación de las integrales para los picos para los restos de (CH₃)₃N-, -CH₂StBu y -CH₂COO-. El análisis del aceite por HRMS (ESI-TOF) produjo un ión importante a m/z 820,4972, calculado para M + Na⁺ = C₄₀H₈₀NNaO₈PS₂⁺ 820,4960.

A. Variante de Síntesis 1 – Tratamiento con fosfolipasa-A2

25 **Compuesto 24.** Una mezcla del compuesto **23** y productos monoacetilados como se ha descrito anteriormente (3,1 g, 3,9 mmol) se disolvió en Et₂O (400 ml) y metanol (30 ml). Se añadió tampón de borato (100 ml, pH 7,4 0,1 M, 0,072 mM en CaCl₂), seguido de fosfolipasa-A2 (sin veneno de abeja, 130 unidades, Sigma). La mezcla resultante se dejó en agitación durante 10 h., punto en el que la TLC (sílice, MeOH: agua a 4:1 – se demostró que el sistema de disolvente anterior de DCM: MeOH: NH₄OH concentrado a 10:5:1 era ineficaz) mostraba la ausencia del material de partida (R_f = 0,7) y la aparición de una nueva aplicación puntual (R_f = 0,2). Las fases orgánica y acuosa se separaron y la fase acuosa se lavó con éter (2 x 250 ml). El producto se extrajo de la fase acuosa con una mezcla de DCM:MeOH (2:1, 2 x 50 ml). A continuación, las fases orgánicas se concentraron por evaporación rotatoria para producir el producto en forma de una cera de color blanco (1,9 g, rendimiento de un 86 %) que se mostró por RMN que era un producto puro (compuesto **24**). RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) δ 1,25-1,27 (s a, 12 H), 1,31 (s, 9 H), 1,35-1,45 (m, 2 H), 1,52-1,60 (m, 4 H), 2,31 (t, 2 H, J = 7,5 Hz), 2,51 (t, 2 H, J = 7,5 Hz), 3,28 (s a, 9 H) 3,25-3,33 (s a, 2 H), 3,78-3,86 (m, 1 H), 3,88-3,96 (m, 2 H), 4,04-4,10 (m, 2 H), 4,26-4,34 (m, 2 H). El análisis de la cera por HRMS (ESI-TOF) produjo un ión importante a m/z 550,2936, calculado para M + Na⁺ 550,2943 (C₂₄H₅₀NNaO₇PS₂⁺), y un m/z a 528,3115, calculado para MH⁺ 528,3124 (C₂₄H₅₁NO₇PS₂⁺).

40 Anal. Calculado para C₂₄H₅₀NO₇PS + 2 H₂O (563,73): C, 51,13; H, 9,66; N, 2,48. Encontrado: C, 50,90; H, 9,37; N, 2,76.

45 **Compuesto 26.** El compuesto liso **24** (1,5 g, 2,7 mmol) se disolvió en una mezcla de sec-butanol (5 ml) y Et₂O (200 ml), y la mezcla turbia resultante se sonicó hasta que la turbidez se disipó. Se añadió tampón (200 ml, pH 5,8, NaOAc 0,2 M, CaCl₂ 0,08 M), seguido de extracto de col (80 ml de extracto de cola de Saboya (que contiene fosfolipasa-D), que contenía 9 mg de proteína/ml). La reacción se agitó durante 1 día y se controló por TLC (C₁₈ RP SiO₂, ACN: agua a 5:1), R_f del material de partida y producto = 0,3 y 0,05, respectivamente. Para empujar a la reacción a la finalización, si fuera necesario se añadía una porción adicional de extracto de col (50 ml) y la reacción se agitó durante un día adicional. Este proceso se repitió dos veces más, si fuera necesario, para completar la conversión. Cuando la reacción se completó, la mezcla se concentró en el rotavapor para retirar el éter, y a continuación se añadió solución de EDTA (0,5 M, 25 ml) y el producto se extrajo en una mezcla a 5:4 de MeOH: DCM (300 ml). La concentración de la fase orgánica seguido de recristalización del residuo a partir de DCM y acetona proporcionó el producto puro (0,9 g, rendimiento de un 75 %). RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ 1,25-1,27 (s a, 12 H), 1,33 (s, 9 H), 1,52-1,60 (m, 4 H), 2,34 (t, 2 H, J = 7,5 Hz), 2,52 (t, 2 H, J = 7,5 Hz), 3,6-3,8 (s a, 1 H), 3,85-3,97 (s a, 2 H), 4,02- 4,18 (m, 2 H).

55 **Compuesto 27.** La muestra de LPA protegido, compuesto **26** (0,150 g, 0,34 mmol), se lavó con metanol y se añadió a un vial en la caja de guantes. A continuación, ésto se suspendió en una mezcla de AcOH:THF (1:1, 10 ml), que nunca se disolvió totalmente usó después de 1 h. de sonicación. A continuación, se añadió [Me₂SSMe]OTf sólido (0,114 g, 0,44 mmol). Esto se dejó en agitación durante 18 h. La reacción se controló por retirada de una alícuota, concentrándola a sequedad al vacío, y volviéndola a disolver o suspendiendo el residuo en CD₃OD para observación del desplazamiento de RMN ¹H del pico de CH₂ más cercano al azufre. El material de partida presentaba un pico a 2,52 ppm, mientras que el disulfuro asimétrico formado en esta unión presentaba un pico a aproximadamente 2,7 ppm. Este material (compuesto **27**) no se aisló ni se caracterizó adicionalmente.

65 **Compuesto 28.** La mezcla que contenía el compuesto **27** se trató con agua (100 μl) seguido inmediatamente por PMe₃ (0,11 g, 1,4 mmol). Después de agitar durante 3 h. El disolvente se retiró al vacío para producir un sólido de

color blanco insoluble. Se añadió metanol (5 ml), la mezcla se centrifugó, y las aguas madre se decantaron. La concentración del ácido proporciona 120 mg (rendimiento de un 91 %) del compuesto **28**, un sólido de color beige. El compuesto **28** es un hapteno de LPA tiolado que se puede conjugar con un vehículo, por ejemplo, albúmina o KLH, a través de formación de enlace disulfuro. Caracterización del compuesto **28**: RMN ¹H (1:1 CD₃OD:CD₃CO₂D, 500 MHz) δ 1,25-1,35 (s a, 12 H), 1,32-1,4 (m, 2 H), 1,55-1,6 (m, 4 H), 2,34 (t, 2H, J = 7), 2,47 (t, 2H, J = 8,5), 3,89-3,97 (s a, 2 H), 3,98-4,15 (m, 2 H), 4,21 (m, 1H). El ES de ión negativo de la muestra disuelta en metanol produjo un ión predominante a m/z = 385,1.

EJEMPLO 4: Anticuerpos para S1P

Un tipo de anticuerpo terapéutico se une de forma específica a esfingolípidos no deseados para conseguir efectos beneficiosos tales como, por ejemplo, (1) disminución de la concentración eficaz de esfingolípidos tóxicos no deseados (y/o la concentración de sus precursores metabólicos) que podría estimular un efecto no deseado tal como un efecto cardiotóxico, tumorigénico, o angiogénico; (2) para inhibir la unión de un esfingolípidos tumorigénico no deseado, tóxico o angiogénico para un receptor celular del mismo, y/o para disminuir la concentración de un esfingolípidos que está disponible para unión a receptor de este tipo. Algunos ejemplos de efectos terapéuticos de este tipo incluyen, pero no se limitan a, el uso de anticuerpos anti-S1P para disminuir la concentración en suero *in vivo* del S1P disponible, noqueando de ese modo o al menos limitando los efectos tumorigénicos o angiogénicos de los S1P y su papel en la insuficiencia cardíaca post-MI, cáncer, o enfermedades fibrogénicas.

El S1P tiolado (compuesto 10 de la Figura 1) se sintetizó para que contuviera un grupo reactivo capaz de reticulación de las características estructurales esenciales de S1P a un resto de vehículo tal como KLH. Antes de la inmunización, el análogo de tio-S1P se conjugó a través de reticulación de IOA o SMCC a vehículos proteínicos (por ejemplo, KLH) usando protocolos convencionales. SMCC es un agente de reticulación heterobifuncional que reacciona con láminas primarias y grupos sulfhidrilo, y representa un agente de reticulación preferente.

Se inmunizaron ratones Swiss Webster o BALB-C cuatro veces durante un periodo de dos meses con 50 µg de inmunógeno (conjugado facilitado por SMCC de S1P tiolado y KLH) por inyección. Las muestras de suero se recogieron dos semanas después de la segunda, tercera y cuarta inmunizaciones y se identificaron sistemáticamente por ELISA directo para la presencia de anticuerpos anti-S1P. Los bazos de los animales que presentaban altas titulaciones del anticuerpo se usaron posteriormente para generar hibridomas mediante procedimientos de fusión convencionales. Los hibridomas resultantes se cultivaron hasta confluencia estándar, tras lo cual el sobrenadante celular se recogió para análisis de ELISA. De los 55 que se inmunizaron, 8 tenían buena capacidad de respuesta, lo que muestra titulaciones en sueros significativos de anticuerpos reactivos para S1P. Posteriormente, las fusiones se realizaron usando los bazos de estos ratones y células de mieloma de acuerdo con procedimientos establecidos. A continuación, los 1.500 hibridomas resultantes se identifican sistemáticamente por ELISA directo, proporcionando 287 hibridomas positivos. De estos 287 identificados sistemáticamente por ELISA directo, 159 presentaban titulaciones significativas. A continuación, cada uno de los 159 hibridomas se expandió en placas de 24 pocillos. Los medios acondicionados con células de los hibridomas expandidos se volvieron a identificar sistemáticamente a continuación para identificar hibridomas estables capaces de secretar anticuerpos de interés. Los ELISA competitivos se realizaron en los 60 hibridomas estables de titulación más elevada.

De los 55 ratones y casi 1.500 hibridomas identificados sistemáticamente, se descubrió un hibridoma que presentaba características de rendimiento que justificaban la clonación de dilución imitada, tal como se requiere para generar en última instancia un anticuerpo monoclonal verdadero. Este proceso proporcionó 47 clones, la mayoría de los cuales se consideraron positivos para la producción de anticuerpos S1P. De estos 47 clones, 6 se expandieron en placas de 24 pocillos y posteriormente se identificaron sistemáticamente mediante ELISA competitivo. De los 4 clones que permanecían positivos, se eligió uno para iniciar la producción a gran escala del anticuerpo monoclonal S1P. A los ratones SCID se les inyectaron estas células y la ascitis resultante se purificó con proteína A (rendimiento de un 50 %) y se analizó para niveles de endotoxina (< 3 EU/mg). Para una ronda de producción de ascitis, se inyectaron 50 ratones, produciendo un total de 125 ml de ascitis. Se formaron isotipos de los anticuerpos como IgG1 kappa, y se consideraron puros en > 95 % por HPLC. El anticuerpo se preparó en fosfato sódico 20 mM con cloruro sódico 150 mM (pH 7,2) y se almacenó a -70 °C.

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

La identificación sistemática de sobrenadante en suero y células para anticuerpos específicos de S1P se realizó con ELISA directo usando el análogo de S1P tiolado descrito en el Ejemplo 1 (es decir, el compuesto 10) como el antígeno. Se realizó un ELISA convencional, como se describe a continuación, excepto porque se diluyeron 50 µl de muestra (sobrenadante en suero o célula) con un volumen igual de PBS/Tween-20 al 0,1 % (PBST) durante la incubación primaria. Los ELISA se realizaron en placas de 96 pocillos para ELISA de unión elevada (Costar) revestidas con 0,1 µg de compuesto 10 sintetizado por vía química conjugado con BSA en tampón de unión (Na₂CO₃

33,6 mM, y NaHCO₃ 100 mM; pH 9,5). El S1P-BSA tiolado se incubó a 37 °C durante 1 h. a 4 °C durante una noche en los pocillos de la placa para ELISA. A continuación, las placas se lavaron cuatro veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10,14 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4) y se bloquearon con PBST durante 1 h. a temperatura ambiente. Para la etapa de incubación primaria, 75 µl de la muestra (que contenía el S1P a medir) se incubaron con 5 25 µl de 0,1 µg/ml de mAb anti-S1P diluido en PBST y se añadió a un pocillo de la placa para ELISA. Cada muestra se realizó en pocillos por triplicado. Después de un periodo de incubación de 1 h. a temperatura ambiente, las placas de ELISA se lavaron cuatro veces con PBS y se incubaron con 100 µl por pocillo de 0,1 µg/ml de HRP de cabra anti-ratón secundario (Jackson Immunoresearch) durante 1 h. a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron cuatro veces con PBS y se expusieron a tetrametilbencidina (Sigma) durante 1-10 minutos. La reacción de 10 detección se detuvo mediante la adición de un volumen igual de H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica de las muestras se determinó con medición a 450 nm usando un lector de placas de ELISA EL-X-800 (Bio-Tech).

Para reactividad cruzada, se realizó un ELISA competitivo como se ha descrito anteriormente, excepto por las siguientes alteraciones. La incubación primaria consistía en el competidor (S1P, SPH, LPA, etc.) y un mAb anti-S1P 15 conjugado con biotina. La biotilación del anticuerpo monoclonal purificado se realizó usando el kit EZ-Link de Sulfo-NHS-Biotilación (Pierce). La incorporación de biotina se determinó de acuerdo con un protocolo por kit y variaba de 7 a 11 moléculas de biotina por anticuerpo. El competidor se preparó como si a continuación: las soluciones de reserva lipídicas se sonicaron y se secaron en atmósfera de argón antes de su reconstitución en DPBS/BSA [1 mg/ml de BSA sin ácido graso (Calbiochem) en DPBS (Invitrogen 14040-133)]. El mAb anti-S1P purificado se 20 diluyó cuando fue necesario en PBS/Triton X-100 al 0,5 %. Las soluciones de competidor y anticuerpo se mezclaron en conjunto para generar 3 partes de competidor con respecto a 1 parte de anticuerpo. Para generar señales se usó anticuerpo secundario de estreptavidina conjugada con HRP (Jackson Immunoresearch).

Otro aspecto de los datos de ELISA competitivo es que muestra que el mAb anti-S1P era incapaz de distinguir el 25 análogo de S1P tiolado (compuesto 10) del S1P natural que se añadió en el experimento de competición. También demuestra que el anticuerpo no reconoce ningún producto de oxidación porque el análogo se construyó sin ningún doble enlace (al igual que también es cierto para el análogo de LPA descrito en el Ejemplo 3). El mAb anti-S1P también se sometió a ensayo frente al producto natural que contenía el doble enlace a que se permitió 70 a temperatura ambiente durante 48 horas. La HPLC en fase inversa del S1P natural se realizó de acuerdo con métodos informados anteriormente (Deutschman, *et al.* (Julio de 2003), *Am Heart J.*, vol. 146 (1): 62-8), y los 30 resultados no mostraron diferencia en el tiempo de retención. Además, una comparación de las características de unión del anticuerpo monoclonal con respecto a los diversos lípidos sometidos a ensayo indica que el epítipo reconocido por el anticuerpo no implicaba a la cadena de hidrocarburo en la región del doble enlace del S1P natural. Por otro lado, el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal es la región que contiene el amino alcohol en la 35 cadena principal de la base de esfingosina más el fosfato libre. Si el fosfato libre está unido con una colina (tal como es el caso con SPC), entonces la unión se vería reducida en cierto modo. Si el grupo amino está esterificado con un ácido graso (como es el caso con C1P), no se observaba unión al anticuerpo. Si la cadena principal de amino alcohol de esfingosina estaba sustituida con una cadena principal de glicerol (tal como es el caso con LPA), entonces el anticuerpo monoclonal específico para S1P no presentaba unión. Estos datos de formación de mapas de 40 epítipos indican que en S1P existe solamente un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal, y que este epítipo se define por el grupo de cabeza polar única de S1P.

En un experimento similar que usa mediciones de ELISA, se evaluaron algunos materiales de control adecuados 45 para asegurar que este anticuerpo monoclonal anti-S1P no reconocía el vehículo de proteína o que el agente de reticulación. Por ejemplo, el agente de reticulación normal SMCC se intercambiaba por IOA en conjugación con el S1P tiolado con respecto a BSA como el material de depósito de ELISA. Cuando se usó IOA, las características de unión del anticuerpo eran casi idénticas a cuando se usó BSA-SMCC-S1P tiolado. De forma análoga, KLH se intercambiaba por BSA como la proteína que formaba complejo con S1P como el material de depósito. En este experimento, 50 tampoco había diferencias significativas en las características de unión del anticuerpo.

Cinética de unión: la cinética de unión de S1P con su receptor u otros restos tradicionalmente ha sido problemática debido a la naturaleza de los lípidos. Muchos problemas se han asociado con la insolubilidad de los lípidos. Para mediciones de BIAcore, estos problemas se superaron inmovilizando S1P directamente a un chip de BIAcore. A 55 continuación, el anticuerpo se dejó fluir sobre la superficie del chip y las alteraciones en la densidad óptica se midieron para determinar las características de unión del anticuerpo a S1P. Para eludir la naturaleza de unión bivalente de los anticuerpos, S1P se revistió en el chip a densidades bajas. Además, el chip se revistió con diversas densidades de S1P (7, 20, y 1000 RU) y los datos de unión al anticuerpo se ajustaron de forma global a un modelo de interacción a 1:1. Los cambios en la densidad óptica surgieron debido a la unión del anticuerpo monoclonal a S1P a tres densidades diferentes de S1P. En general, se determinó que la afinidad del anticuerpo monoclonal a S1P era 60 muy elevada, en el intervalo de aproximadamente 88 picomolar (pM) a 99 nM, dependiendo de si se usaba un modelo de unión monovalente o bivalente para analizar los datos de unión.

EJEMPLO 5: mAb quimérico para S1P

65 Como se usa en el presente documento, el término anticuerpo "quimérico" (o "inmunoglobulina") se refiere a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera que es idéntica homóloga a las secuencias correspondientes

en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos que se obtienen de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (Cabilly *et al.*, mencionado anteriormente; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851 (1984)). Las secuencias de anticuerpo pueden ser de origen en vertebrados o invertebrados, incluyendo mamíferos, aves o peces, incluyendo peces cartilaginosos.

Un anticuerpo quimérico para S1P se generó usando las regiones variables (Fv) que contenían las regiones activas de unión a S1P del anticuerpo murino a partir de un hibridoma en particular (número SD-5362 de almacenamiento de depósito de seguridad de la ATCC) con la región Fc de una inmunoglobulina IgG1 humana. Las regiones Fc contenían los dominios CL, ChL, y Ch3 del anticuerpo humano. Sin quedar limitado a ningún método en particular, algunos anticuerpos quiméricos también se podrían haber generado a partir de regiones Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, o IgM humanas. Como observarán los expertos en la materia, algunos anticuerpos "humanizados" se pueden generar por injerto de las regiones determinantes de la complementariedad (las CDR, por ejemplo CDR1-4) del mAb anti-S1P murino con regiones marco conservadas de anticuerpo humano (por ejemplo, Fr1, Fr4, etc.) tales como las regiones marco conservadas de una IgG1.

Para los experimentos de ELISA directos, el anticuerpo quimérico para S1P presentaba características de unión similares a las del anticuerpo monoclonal totalmente murino. Los ELISA se realizaron en placas de 96 pocillos para ELISA de unión elevada (Costar) revestidas con 0,1 µg de compuesto 10 sintetizado por vía química conjugado con BSA en tampón de unión (Na₂CO₃ 33,6 mM, y NaHCO₃ 100 mM; pH 9,5). El S1P-BSA tiolado se incubó a 37 °C durante 1 h. o a 4 °C durante una noche en la placa para ELISA. A continuación, las placas se lavaron cuatro veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10,14 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4) y se bloquearon con PBST durante 1 h. a temperatura ambiente. Para la etapa de incubación primaria, 75 µl de la muestra (que contenía el S1P a medir) se incubaron con 25 µl de 0,1 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-S1P diluido en PBST y se añadió a un pocillo de la placa para ELISA. Cada muestra se realizó en pocillos por triplicado. Después de un periodo de incubación de 1 h. a temperatura ambiente, las placas de ELISA se lavaron cuatro veces con PBS y se incubaron con 100 µl por pocillo de 0,1 µg/ml de HRP de cabra anti-ratón secundario (Jackson Immunoresearch) durante 1 h. a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron cuatro veces con PBS y se expusieron a tetrametilbencidina (Sigma) for 1-10 minutos. La reacción de detección se detuvo mediante la adición de un volumen igual de H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica de las muestras se determinó con medición a 450 nm usando un lector de placas de ELISA EL-X-800 (Bio-Tech).

El método preferente para medir cualquier titulación de anticuerpo en el suero de un animal inmunizado o medios acondicionados con células (es decir, sobrenadante) de una célula que produce anticuerpo tal como un hibridoma, implica el revestimiento de la placa de ELISA con un ligando diana (por ejemplo, un análogo tiolado de S1P, LPA, etc.) que se ha unido de manera covalente a un vehículo de proteína tal como BSA.

EJEMPLO 6: Anticuerpos monoclonales para LPA

Producción de Anticuerpo

Aunque se ha informado de algunos anticuerpos policlonales frente al LPA de origen natural en la bibliografía (Chen JH. *et al. Bioorg Med Chem Lett.* 7 de agosto de 2000; 10 (15): 1691-3), algunos anticuerpos monoclonales no se han descrito. Usando un enfoque similar al que se describe en el Ejemplo 4, un análogo de tio-LPA C-12 (compuesto 28 en el Ejemplo 3) como el componente fundamental de un hapteno formado por la reticulación del análogo a través de un grupo SH reactivo a un vehículo de proteína (KLH) a través de reticulación química convencional usando cualquiera de IOA o SMCC como el agente de reticulación, se generaron anticuerpos monoclonales frente a LPA. Para hacer esto, los ratones inmunizaron con el hapteno de tio-LPA-KLH (en este caso, LPA tiolado:SMCC:KLH) usando métodos que se describen en el Ejemplo 4 para la generación de anticuerpos monoclonales anti-S1P. De los 80 ratones inmunizados frente al análogo de LPA, los cinco animales que mostraban las titulaciones más elevadas frente al LPA (determinados usando un ELISA en el que el mismo análogo de LPA (compuesto 28) que se usa en el hapteno se conjugó con BSA usando SMCC y se fijó en las placas de ELISA) se eligieron para desplazarse a la fase de desarrollo del hibridoma.

Los bazos de estos cinco ratones se cosecharon y se generaron hibridomas con técnicas convencionales. En resumen, el ratón proporciono líneas de células de hibridoma (denominadas 504A). De todos los hibridomas sembrados en placas de la serie 504A, 66 presentaban producción de anticuerpo positiva como se mide con el ELISA de identificación sistemática descrita anteriormente.

La Tabla 1, que sigue a continuación, muestra las titulaciones de anticuerpo en los sobrenadantes celulares de hibridomas creados a partir de los bazos de dos ratones que respondían a un hapteno análogo de LPA en el que el análogo de LPA tiolado estaba reticulado con KLH usando agentes de reticulación heterobifuncionales. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-LPA no reaccionaban con el agente de reticulación o con el vehículo de proteína. De forma importante, los datos muestran que los hibridomas producen anticuerpos frente a LPA, y no

frente a S1P.

Tabla 1: hibridomas de LPA

n.º de ratón	3ª DO de titulación de sangre a 1:312, 500	Sobrenadantes de 24 pocillos	DO de unión a LPA a 1:20	DO de unión a S1P a 1:20	Reactividad cruzada c/S1P*
1	1,242	1.A.63	1,197	0,231	baja
		1.A.65	1,545	0,176	ninguna
2	0,709	2.B.7	2,357	0,302	baja
		2.B.63	2,302	0,229	baja
		2.B.83	2,712	0,175	ninguna
		2.B.104	2,57	0,164	ninguna
		2.B.1B7	2,387	0,163	ninguna
		2.B.3A6	2,227	0,134	ninguna

5 *Reactividad cruzada con S1P de sobrenadantes de 24 pocillos: elevada = DO > 1,0-2,0 a [1:20]; media = DO 0,4-1,0 a [1:20]; baja = DO 0,4-0,2 a [1:20]; ninguna = DO < 0,2 DO a [1:20].

10 El desarrollo de los mAb anti-LPA en ratones se controló por ELISA (unión directa a LPA a 12:0 y 18:1 y ELISA de competición). Una respuesta inmunológica significativa se observó en al menos la mitad de los ratones inmunizados y cinco ratones con la titulación de anticuerpos más elevada se seleccionaron para iniciar el desarrollo de la línea de células hibridoma después de fusión de bazo.

15 Después de la identificación sistemática inicial de aproximadamente 2000 líneas de células de hibridomas generadas a partir de estas 5 fusiones, un total de 29 líneas de células de hibridoma que secretan anti-LPA presentaban una unión elevada a LPA 18:1. De estas líneas de células de hibridoma, 24 se subclonaron adicionalmente y se caracterizaron en un panel de ensayos de ELISA. De los 24 clones que permanecieron positivos, seis clones de hibridoma se seleccionaron para caracterización adicional. Su selección se basó en sus propiedades bioquímicas y biológicas superiores. Las líneas de células de hibridoma de ratón, 504B3-6C2, 504B7,1, 504B58/3F8, 504A63,1 y 504B3A6 (que corresponden a los clones denominados en el presente documento B3, B7, B58, A63, y B3A6, respectivamente) se recibieron el 8 de mayo de 2007 a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Depósito de Patentes de la ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110) para fines de depósito de patentes en representación de LPath Inc. y se les concedieron los números de depósito PTA-8417, PTA-8420, PTA-8418, PTA-8419 y PTA-8416, respectivamente.

25 Todos los anticuerpos anti-LPA y partes de los mismos mencionados en el presente documento se obtuvieron a partir de estas líneas celulares.

Cinética de unión directa

30 La unión de 6 mAb anti-LPA (B3, B7, B58, A63, B3A6, D22) a LPA a 12:0 y 18:1 (0,1 uM) se midió con ELISA. Los valores de la CE₅₀ se calcularon a partir de curvas de valoración usando 6 concentraciones crecientes de mAb purificados (de 0 a 0,4 ug/ml).

La CE₅₀ representa la concentración de anticuerpo eficaz con un 50 % de la unión máxima. Máx representa la unión máxima (pesada como DO₄₅₀). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

35

Tabla 2 – Cinética de Unión Directa de los mAb Anti-LPA

		B3	B7	B58	D22	A63	B3A6
LPA 12:0	CE ₅₀ (nM)	1,420	0,413	0,554	1,307	0,280	0,345}
	Máx (DO ₄₅₀)	1,809	1,395	1,352	0,449	1,269	1,316
LPA 18:1	CE ₅₀ (nM)	1,067	0,274	0,245	0,176	0,298	0,469
	Máx (DO ₄₅₀)	1,264	0,973	0,847	0,353	1,302	1,027

40 Los parámetros cinéticos k_a (constante de tasa de asociación), k_d (constante de tasa de disociación) y K_D (constante de equilibrio de asociación) se determinaron para los 6 candidatos principales usando la máquina de Biosensor

BlAcore 3000. En este estudio, el LPA se inmovilizó en la superficie del sensor y los mAb anti-LPA se dejaron fluir en solución a través de la superficie. Como se muestra, los seis mAb se unió a LPA con valores de K_D similares que variaban de 0,34 a 3,8 pM y parámetros cinéticos similares.

5 Los mAb de murino anti-LPA presentan afinidad elevada hacia el LPA

El LPA se inmovilizó en el chip del sensor a densidades que variaba en 150 unidades de resonancia. Las diluciones de cada mAb se pasaron sobre el LPA inmovilizado y las constantes cinéticas se obtuvieron mediante regresión no lineal desfasada de asociación/disociación. Los errores se proporcionan como la desviación estándar usando al menos tres determinaciones en realizaciones por duplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Las afinidades aparentes se determinaron con $K_D = k_d/k_a$.

k_a = Constante de tasa de asociación en $M^{-1}s^{-1}$ k_d = Constante de tasa de disociación en s^{-1}

15 **Tabla 3 – Afinidad de mAb anti-LPA para el LPA**

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

Perfil de especificidad de seis mAb anti-LPA

20 Se han identificado muchas isoformas de LPA que son biológicamente activas y es preferente que el mAb las reconozca a todas hasta un cierto punto de relevancia terapéutica. La especificidad de los mAb anti-LPA se evaluó usando un ensayo de competición en el que el lípido se añadió a la mezcla de lípido inmovilizado con anticuerpo.

25 Los ensayos de ELISA de competición se realizaron con 6 mAb para evaluar su especificidad. El LPA 18:1 se capturó en placas de ELISA. Cada lípido competidor (hasta 10 uM) se diluyó en serie en BSA (1 mg/ml)-PBS y a continuación se incubó con los mAb (3 nM). A continuación, las mezclas se transfirieron a pocillos revestidos con LPA y la cantidad de anticuerpo unido se midió con un anticuerpo secundario. Los datos se normalizan hasta señal máxima (A_{450}) y se expresan como porcentaje de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado. CI_{50} : Concentración de inhibición semimáxima; MI: Inhibición máxima (% de unión en ausencia de inhibidor); ---: no se calcula debido a la inhibición débil. Un resultado de inhibición elevada indica el reconocimiento del lípido competidor por el anticuerpo. Como se muestra en la Tabla 4, todos los mAb anti-LPA reconocían las diferentes isoformas de LPA.

Tabla 4. Perfil de especificidad de seis mAb anti-LPA

	LPA 14:0		LPA 16:0		LPA 18:1		LPA 18:2		LPA 20:4	
	CI_{50}	MI	CI_{50}	MI	CI_{50}	MI	CI_{50}	MI	CI_{50}	MI
	uM	%	uM	%	uM	%	uM	%	uM	%
B3	0,02	72,3	0,05	70,3	0,287	83	0,064	72,5	0,02	67,1
B7	0,105	61,3	0,483	62,9	> 2,0	100	1,487	100	0,161	67
B58	0,26	63,9	5,698	> 100	1,5	79,3	1,240	92,6	0,304	79,8
B104	0,32	23,1	1,557	26,5	28,648	>100	1,591	36	0,32	20,1
D22	0,164	34,9	0,543	31	1,489	47,7	0,331	31,4	0,164	29,5
A63	1,147	31,9	5,994	45,7	---	---	---	---	0,119	14,5
B3A6	0,108	59,9	1,151	81,1	1,897	87,6	---	---	0,131	44,9

35 De forma interesante, los mAb anti-LPA eran capaces de diferencia entre los LPA 12:0 (lauroílo), 14:0 (miristoílo), 16:0 (palmitoílo), 18:1 (oleoílo), 18:2 (linoleoílo) y 20:4 (araquidonoílo). El orden de importancia para CE_{50} era para los lípidos insaturados 18:2 > 18:1 > 20:4 y para los lípidos saturados 14:0 > 16:0 > 18:0. Los mAb con especificidad elevada son deseables para desarrollo farmacológico máximo. La especificidad de los mAb anti-LPA se evaluó para su unión a biolípidos relacionados con LPA tales como ácido distearoilfosfatídico, lisofosfatidilcolina, S1P, ceramida y ceramida-1-fosfato. Ninguno de los seis anticuerpos demostró reactividad cruzada con respecto a distearoil PA y

LPC, el precursor metabólico inmediato de LPA.

EJEMPLO 7: Actividades anti-cáncer de anticuerpos monoclonales anti-LPA

5 Proliferación de células cancerosas

El LPA es un potente factor de crecimiento que apoya la supervivencia y la proliferación celular mediante estimulación de G_i , G_q y $G_{12/13}$ a través de receptores de GPCR y activación de sucesos de señalización cadena abajo. Las líneas celulares se sometieron a ensayo para su respuesta proliferativa a LPA (0,01 mM a 10 mM). La proliferación celular se sometió a ensayo usando el kit de ensayo de proliferación celular de Chemicon (Temecula CA) (Panc-1) y la titulación Cell-Blue de Pierce (Caki-1). Cada punto de datos es la media de tres experimentos independientes. El LPA aumentaba la proliferación de 7 líneas de células tumorales derivadas de ser humano de una manera dependiente de la dosis eluyendo células SKOV3 y OVCAR3 (cáncer de ovario), Panc-1 (cáncer pancreático), Caki-1 (carcinoma de células renales), DU-145 (cáncer de próstata), A549 (carcinoma de pulmón), y HCT-116 (adenocarcinoma colorrectal) y una línea de células tumorales derivadas de ratón, RBL-2H3 (células de leucemia de ratas). Aunque las células derivadas de tumor normalmente tienen niveles de proliferación basales elevados, parece que LPA aumenta adicionalmente la proliferación en la mayoría de las líneas de células tumorales. Los mAb anti-LPA (B7 y B58) se evaluaron para la capacidad para inhibir la proliferación inducida por LPA en líneas de células de cáncer humano. Se mostró que el aumento de la proliferación inducida por LPA se mitigaba mediante la adición de mAb anti-LPA.

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

Se investigó la capacidad del LPA para proteger las células de tumores de ovario frente a la apoptosis cuando se exponen a niveles clínicamente relevantes del agente quimioterapéutico, paclitaxel (Taxol). Las células SKVO3 se trataron con FBS al 1 % (S), Taxol (0,5 mM), mAb +/- anti-LPA durante 24 h. El LPA protegía a las células SKVO3 de la apoptosis inducida por Taxol. La más se evaluó por medición de la actividad de caspasa como lo recomienda el fabricante (Promega). Como se ha anticipado, el LPA protegía a la mayoría de las líneas de células de cáncer sometidas a ensayo de la muerte celular inducida por taxol. Cuando el anticuerpo anti-LPA, LT3000, se añadió a una selección de las células que responden a LPA, éste bloqueaba la capacidad de LPA para proteger las células de la muerte inducida por el proporcionada por el suero. Se calcula que el suero contiene aproximadamente 5-20 uM de LPA. La activación de la caspasa-3,7 inducida por taxol en células SKOV3 y la adición de suero a las células protegía las células de la apoptosis. La activación de caspasa inducida por taxol aumentaba mediante la adición de LT3000 al medio de cultivo. Esto sugiere que los efectos protectores y antiapoptóticos de LPA se retiraban con la neutralización mediada por anticuerpo selectivo del LPA presente en suero.

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

Una característica importante de los cánceres metastásicos es que las células tumorales escapan de la inhibición por contacto y migran más allá de su tejido de origen. Se ha mostrado que el LPA estimula el potencial metastásico en varios tipos de células cancerosas. Por consiguiente, los inventores sometieron ensayo la capacidad del mAb anti-LPA para bloquear la migración celular dependiente de LPA en varias líneas de células de cáncer by usando el ensayo de raspado de monocapa celular. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron hasta confluencia. Después de 24 h de inanición, el centro de los pocillos se raspó con una punta de pipeta. En este "ensayo de raspado" aceptado en la técnica, las células responden a la herida raspada en la monocapa celular de una manera estereotípica mediante migración hacia el raspado y cerca de la herida. La evolución de la migración y el cierre de la herida se controlan mediante fotografía digital con un aumento de 10 x en los puntos temporales deseados. Las células no se trataron (NT), se trataron con LPA (2,5 mM) con o c/o mAb B7 (10 µg/ml) o un anticuerpo no especificó de emparejamiento de isotipos (NS) (10 µg/ml). En las células sin tratar, un gran hueco permanece entre los bordes de la monocapa después del raspado. Por el contrario, las células tratadas con LPA presentan solamente un pequeño hueco que permanece en el mismo punto temporal, y unas pocas células están haciendo contacto a través del hueco. En las células tratadas tanto con LPA como con el anticuerpo B7 anti-LPA, el hueco en este punto temporal era varias veces mayor que el del tratamiento solamente con LPA aunque no tan grande como el de las células de control sin tratar. Esto muestra que el anticuerpo anti-LPA presentaba un efecto inhibitorio de la migración estimulada por LPA de las células de carcinoma de células renales (Caki-1). Se obtuvieron datos similares con los mAb B3 y B58. Esto indica que el mAb anti-LPA puede reducir la migración mediada por LPA de líneas celulares que se obtienen originalmente del carcinoma metastásico.

Los mAb anti-LPA inhiben la liberación de citoquinas pro-tumorígenicas de células tumorales

El LPA está implicado en el establecimiento y la progresión del cáncer al proporcionar un microentorno de procrecimiento tumoral y estimulando el angiogénesis. En particular, los aumentos de los factores procrecimiento tales como IL-8 y VEGF se han observado en células cancerosas. IL-8 está fuertemente implicado en la evolución y diagnóstico del cáncer. IL-8 puede ejercer su efecto en el cáncer a través de la estimulación de la neovascularización e inducción de la quimiotaxis de neutrófilos y células endoteliales. Además, la sobreexpresión de IL-8 se ha correlacionado con el desarrollo de un fenotipo resistente a fármacos de muchos tipos de cánceres

humanos.

Se sometieron a ensayo tres mAb anti-LPA (B3, B7 y B58) por sus capacidades para reducir la producción de IL-8 *in vitro* en comparación con un anticuerpo no específico (NS). Las células Caki-1 se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron hasta confluencia. Después de durante una noche inactivación en suero, las células se trataron con LPA 18:1 (0,2 mM) con o sin mAb anti-LPA, B3, B7, B58 o NS (No Especifico). Después de 24 h, los sobrenadantes cultivados de células de cáncer renal (Caki-1), se trataron con o sin LPA y en presencia de aumento de concentraciones de los mAb anti-LPA, B3, B7 y B58, se recogieron y se analizaron para niveles de IL-8 usando un kit de ELISA disponible en el mercado (Kit de Cuantiquina humana, R&D Systems, Minneapolis, MN). En las células tratadas previamente con los mAb anti-LPA, la expresión de IL-8 se reducía de forma significativa de una manera dependiente de la dosis (de 0,1-30 µg/ml de mAb) mientras que LPA aumentaba la expresión de IL-8 en un promedio de un 100 % en células no tratadas. Se obtuvieron resultados similares con el otro factor proangiogénico bien conocido, VEGF. La inhibición de la liberación de IL-8 por los mAb anti-LPA también se observó que en otras líneas de células cancerosas tales como la línea Panc-1 de células pancreáticas. Estos datos sugieren que el bloqueo de la liberación del factor proangiogénico es un efecto adicional y potencialmente importante de estos mAb anti-LPA.

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

Uno de los mAb anti-LPA (B7) se sometió a ensayo por su capacidad para mitigar la angiogénesis *in vivo* usando el ensayo de Tapón de Matrigel. Este ensayo usa Matrigel, una mezcla patentada de restos tumorales que incluyen membranas basales derivadas de tumores de murino. Cuando el Matrigel, o su Matrigel derivado reducido por factor de crecimiento (GFR), se inyecta por sc en un animal, solidifica y forma un 'tapón'. Si algunos factores proangiogénicos se mezclan con la matriz antes de su colocación, el tapón será invadido por células endoteliales vasculares que en ocasiones forman vasos sanguíneos. El Matrigel se puede preparar ya sea solo o mezclado con factores de crecimiento recombinante (bFGF, VEGF), o células tumorales y a continuación se puede inyectar por sc en los costados de ratones hembra atímicos de 6 semanas de edad (NCr Nu/Nu). En este ejemplo, las células Caki-1 (carcinoma renal) se introdujeron dentro del Matrigel y produjeron niveles suficientes de VEGF y/o IL8 y LPA. Se prepararon tapones de Matrigel que contenían 5×10^5 células Caki-1 a partir de ratones tratados con solución salina o con 10 mg/kg de mAb-B7 anti-LPA, cada 3 días comenzando el día 1 antes del implante del Matrigel. Los tapones se tiñeron para CD31 endotelial, seguido de cuantificación de la microvasculatura formada en los tapones. Los datos de cuantificación eran la media +/- ETM de al -16 campos/sección de 3 tapones. Los tapones de los ratones tratados con el mAb B7 anti-LPA demostraban una reducción importante en la formación de vasos sanguíneos, tal como se evalúa mediante tinción endoteliales para CD31, en comparación con los tapones de ratones tratados con solución salina. La cuantificación de los vasos teñidos demuestra una reducción superior a un 50 % en la angiogénesis en tapones que contienen Caki-1 de animales tratados con mAb B7 en comparación con animales tratados con solución salina. Esto era una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$ para mAb B7 con respecto solución salina tal como se determina con el ensayo de T de Student) en angiogénesis de células tumorales como resultado de tratamiento con mAb anti-LPA.

Los mAb anti-LPA reducen la progresión del tumor en xenoinjertos renal y pancreático

Se ha mostrado (anteriormente) que los anticuerpos anti-LPA son eficaces en la reducción de la proliferación de células tumorales inducida por LPA, migración, protección de la muerte celular y liberación de citoquinas en múltiples líneas de células tumorales humanas. A continuación, los mAb B58 y B7 se sometieron a ensayo en un modelo de xenoinjerto de cáncer renal y pancreático. A continuación se presentan resultados preliminares que demuestran los efectos antitumorogénicos potenciales del enfoque de anticuerpo anti-LPA.

Los tumores se desarrollaron mediante inyección subcutánea de células del tumor humano, Caki-1 y Panc-1, en el costado izquierdo de ratones atímicos hembra de 4 semanas de edad (NCr Nu/Nu) usando protocolos convencionales. Después de 10 días para Caki-1 y 30 días para Panc-1, cuando se habían formado los tumores sólidos (~200 mm³), los ratones se clasificaron de forma aleatoria en grupos de tratamiento. El tratamiento comenzó mediante administración por i.p. de 25 mg/kg de los mAb anti-LPA o vehículo (solución salina). Los anticuerpos se administraron cada tres días durante el periodo de duración del estudio. Los tratamientos consistían en 25 mg/kg del mAb anti-LPA, B58, para tumores Caki-1, mAb B7 para Panc-1 o solución salina. Los datos son la media +/- ETM de 7 ratones tratados con solución salina y 6 ratones tratados con B58 para el estudio de Caki-1 y 4 ratones tratados con solución salina y 5 ratones tratados con B7 para el estudio de Panc-1. Los volúmenes tumorales se midieron cada dos días usando calibradores electrónicos y el volumen tumoral se determinó con la fórmula, $W^2 \times L/2$. Los animales se sacrificaron posteriormente después de que los tumores hubieran alcanzado 1500 mm³ en el grupo de solución salina. Los volúmenes tumorales y los pesos finales se registraron.

En este experimento preliminar, la capacidad de los mAb anti-LPA to para reducir el volumen del tumor era evidente después de que los tumores alcanzaran aproximadamente 400-500 mm³. En este punto, los tumores de los animales de control continuaban creciendo, mientras que los tumores de los animales tratados con mAb anti-LPA presentaban una tasa de crecimiento menor en ambos modelos de xenoinjerto. Los datos demuestran que el mAb anti-LPA también reducía los pesos tumorales finales de los tumores Caki-1 y Panc-1 cuando se comparaban con los pesos

tumorales de los animales tratados con solución salina.

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

5 Los mAb anti-LPA (B58 y B7) también influirán en los niveles de citoquina proangiogénica en circulación. En animales tratados con el mAb7 anti-LPA (Panc-1), el nivel en suero de la interleuquina-8 (IL-8) no era detectable en ningún animal tratado con anticuerpo, mientras que los niveles en suero de IL-8 eran detectables en xenoinjertos de Panc-1 y Caki-1 después de 85 y 63 días, respectivamente. De forma más importante, se producía una fuerte correlación ($r = 0,98$) entre tamaño del tumor y niveles de IL-8. En los animales portadores de tumores Caki-1, los niveles en suero de IL-8 humano también se redujeron mediante el tratamiento con mAb58 anti-LPA ($r = 0,34$) cuando se comparaba con el tratamiento con solución salina ($r = 0,55$). Como se ha mencionado anteriormente, se cree que la reducción de los niveles de citoquina en circulación se debe a una inhibición directa de la liberación de citoquinas a partir de las células tumorales por sí mismas. Estos datos demuestran la capacidad de los mAb anti-LPA para reducir la progresión del tumor a la vez que también se reducen los efectos de los compuestos proangiogénicos en circulación.

Los mAb anti-LPA reducen la progresión del tumor en un modelo murino de metástasis

20 Una característica importante de la progresión tumoral es la capacidad de un tumor para formar metástasis y formar nódulos de tumor secundario en sitios alejados. Los estudios *in vitro* descritos anteriormente en el presente documento han demostrado la capacidad de LPA para inducir el escape de las células tumorales a la inhibición del contacto y estimulación de la migración en un modelo de raspado para motilidad celular. En estos estudios, los mAb anti-LPA también inhibían los efectores que estimulaban el crecimiento del tumor de LPA. La eficacia del mAb anti-LPA para inhibir la metástasis tumoral *in vivo* también se evaluó. El fenómeno de la metástasis tumoral ha sido difícil de imitar en modelos animales. Muchos investigadores usan un modelo de metástasis "experimental" en el que las células tumorales se inyectan directamente en el torrente sanguíneo.

30 La formación de vasos sanguíneos es un proceso integral de la metástasis debido a que un aumento en el número de células de los vasos sanguíneos significa que las células se tienen que desplazar a una distancia más corta para llegar a la circulación. Se cree que el mAb anti-LPA inhibirá la metástasis de células tumorales *in vivo*, basándose en el hallazgo de que el mAb anti-LPA puede bloquear varias etapas integrales en el proceso de metástasis.

35 Estudio: el melanoma murino altamente metastásico (B16-F10) se usó para examinar el efecto terapéutico de los tres mAb anti-LPA sobre la metástasis *in vivo*. Este modelo ha demostrado ser altamente sensible a los inhibidores de cPA de autotaxina. Los ratones (C57B /6) hembra de 4 semanas edad recibieron una inyección de células tumorales de melanoma murino B16-F10 (100 uL de 5×10^4 células/animal) a través de la vena de la cola. A los ratones (10 por grupo) se les administraron 25 mg/kg de mAb anti-LPA (ya sea B3 o B7) o solución salina cada tres días mediante inyección por i.p. Después de 18 días, los pulmones se cosecharon y se analizaron. Los órganos pulmonares son el sitio de metástasis preferente de las células de melanoma, y por lo tanto se evaluaron estrechamente para nódulos metastásicos. Los pulmones se inflaron con formalina tamponada al 10 % a través de la tráquea para inflar y fijar de forma simultánea, de modo que incluso los pequeños focos se podrían detectar en el examen histológico. Los pulmones se separaron en cinco lóbulos y los tumores se clasificaron por dimensión (grande ≥ 5 mm; medio de 1-4 mm; pequeño < 1 mm) y se hizo recuento con un microscopio de disección. Después del examen de los pulmones, el número de tumores se redujo claramente en los animales tratados con anticuerpo. 45 Para los animales tratados con mAb B3, los tumores grandes se redujeron en un 21 %, los tumores medianos en un 17 % y los tumores pequeños en un 22 %. El análisis estadístico mediante ensayo de T de Student dio un $p < 0,05$ para el número de tumores pequeños en los animales tratados con mAb B3 con respecto a solución salina.

50 Como se ha mostrado en los ejemplos mencionados anteriormente, ahora se ha demostrado que los efectos tumorigénicos de LPA se extienden a líneas celulares de carcinoma renal (por ejemplo, Caki-1) y carcinoma de páncreas (Panc-1). LPA induce la proliferación de células tumorales, la migración y liberación de agentes proangiogénicos y/o prometastásicos, tales como VEGF e IL-8, en ambas líneas celulares. Ahora se ha demostrado que tres anticuerpos anti-LPA monoclonales específicos y de alta afinidad demuestran eficacia en un panel de ensayos de células *in vitro* y en modelos tumorales de angiogénesis y metástasis *in vivo*.

EJEMPLO 8: Clonación de los anticuerpos anti-LPA murinos – visión de conjunto

60 Los anticuerpos quiméricos para LPA se generaron usando las regiones variables (Fv) que contenían las regiones activas de unión a LPA de uno de tres anticuerpos murinos a partir de hibridomas con la región Fc de una inmunoglobulina IgG1 humana. Las regiones Fc contenían los dominios CH1, CH2 y CH3 del anticuerpo humano. Sin quedar limitado a un método en particular, los anticuerpos quiméricos también se podrían haber generado a partir de regiones Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, o IgM humanas. Como los expertos en la materia observarán, algunos anticuerpos "humanizados" se pueden generar por injerto de las regiones determinantes de la complementariedad (las CDR, por ejemplo CDR1-4) de los mAb anti-LPA murinos con regiones marco conservadas de anticuerpo humano (por ejemplo, FR1, FR4, etc.), tales como las regiones marco conservadas de una IgG1.

La estrategia general para la clonación del mAb murino frente a LPA consistió en la clonación de los dominios variables de murino tanto de la cadena ligera (VL) como de la cadena pesada (VH) de cada anticuerpo. Las secuencias consenso de los genes muestran que el fragmento de la región constante es coherente con un isotipo gamma y que la cadena ligera es coherente con un isotipo kappa. Los dominios variables de murino se clonaron en conjunto con el dominio constante de la cadena ligera (CL) y con el dominio constante de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3), dando como resultado una construcción de anticuerpo quimérico.

Los dominios variables de los anticuerpos anti-LPA se clonaron en un sistema de expresión que consiste en el vector pCON de expresión de la Glutamina Sintetasa (GS) (Lonza Inc, Allendale NJ) con regiones constantes de anticuerpo humano. Este sistema de expresión consiste en un vector de expresión que porta los dominios constantes de los genes de anticuerpo y el marcador seleccionable, GS. La Glutamina sintetasa (GS) es la enzima responsable de la biosíntesis de glutamina a partir de glutamato y amoniaco. El vector que porta tanto los genes del anticuerpo como el marcador seleccionable se transfecta en la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) proporcionando suficiente glutamina para que la célula sobreviva sin glutamina exógena. Además, el inhibidor de GS específico, metionina sulfoximina (MSX), se complementa en el medio para inhibir la actividad de GS endógena de forma que solamente pueden sobrevivir las líneas celulares con actividad de GS proporcionada por el vector. Las células transfectadas se seleccionan por su capacidad para crecer en medio libre de glutamina en Presencia de MSX.

Los genes de región constante de los vectores pCON se aislaron a partir de ADN genómico de células de sangre periférica humana. El vector de pCONgamma1f contiene la cadena pesada de una región constante de IgG1f y el vector pCONkappa2 contiene el dominio constante de la cadena ligera kappa.

Los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada se amplificaron por PCR. Los fragmentos amplificados se clonaron en un vector intermedio (pTOPO). Después de la verificación de las secuencias, los dominios variables se reunieron a continuación en conjunto con sus respectivos dominios constantes. El dominio variable humanizado de la cadena ligera se clonó en pCONkappa2 y el dominio variable humanizado de la cadena pesada se clonó en pCONgamma1f. El procedimiento de clonación incluía el diseño de un cebador cadena arriba para incluir una secuencia de péptido señal, una secuencia Kozak consenso que precede al codón de inicio ATG para mejorar la iniciación de la traducción, y el sitio de corte en la posición 5', HindIII. El cebador cadena abajo se diseñó para que incluyera el sitio de corte en la posición 3', ApaI, para la cadena pesada y BsiWI para la cadena ligera.

Los vectores que contenían los dominios variables junto con sus respectivos dominios constantes se transfectaron en células de mamífero. Tres días después de las transfecciones, los sobrenadantes se recogieron y se analizaron mediante ELISA para unión a LPA. Las características de unión para los anticuerpos quiméricos se muestran en la Tabla 5. "HC" y "LC" indican las identidades de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente.

Tabla 5: Características de unión de los anticuerpos anti-LPA quiméricos, B3, B7 y B58.

	HC	x	LC	Titulación (ug/ml)	CE ₅₀ (ng/ml)	DO Máx
<u>1</u>	B7		B7	3,54	43,24	2,237
<u>2</u>	B7		B58	1,84	25,79	1,998
<u>3</u>	B7		B3	2,58	24,44	2,234
<u>4</u>	B58		B7	3,80	38,99	2,099
<u>5</u>	B58		B58	3,42	41,3	2,531
<u>6</u>	B58		B3	2,87	29,7	2,399
<u>7</u>	B3		B7	4,18	49,84	2,339
<u>8</u>	B3		B58	0,80	20,27	2,282
<u>9</u>	B3		B3	4,65	42,53	2,402

A partir de la Tabla 5 se puede observar que es posible optimizar la unión del anticuerpo a LPA mediante la recombinación de cadenas ligeras y cadenas pesadas de diferentes hibridomas (es decir, diferentes clones) en moléculas quiméricas.

Materiales y Métodos para la Clonación, Expresión y Caracterización de las Regiones Variables del Anticuerpo Anti-LPA

Clonación de las regiones variables a partir de líneas de células de hibridoma

Los clones de las líneas de células de hibridoma anti-LPA se cultivaron en DMEM (Medio de Eagle Modificado con Dulbecco con GlutaMAX™ I, 4500 mg/l de D-Glucosa, Piruvato Sódico; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, 111-035-003), FBS al 10 % (Clon I Fetal Estéril, Perbio Science), y 1X de glutamina/Penicilina/Estreptomina (Gibco/Invitrogen). El ARN total se aisló de 10⁷ células de hibridoma usando un procedimiento basado en el kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Alemania). El ARN se usó para generar una primera hebra de ADNc siguiendo el protocolo del fabricante para el Kit de Amplificación dec ADN SMART RACE (Clonetech).

El ADNc de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (VH) se amplificó por PCR usando los cebadores enumerados en la Tabla 6. La preparación de la PCR de la región variable de cadena pesada fue como sigue a continuación: MHCG1 (cebador conocido de la región constante de IgG1) se combinó con cebadores de la región V del Grupo 1 y del Grupo 2 para los cinco anticuerpos. El producto de cada reacción se ligó en el vector pCR2.1®-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad CA) usando el kit y secuencia de clonación TOPO-TA®.

De forma análoga, las regiones variables de la cadena ligera de inmunoglobulina (VK) se amplificaron usando the los cebadores enumerados en la Tabla 7. La preparación de la PCR de la región variable de cadena ligera fue como sigue a continuación: cada uno de dos cebadores de región constante se combinaron con cebadores de la región V del Grupo 1, Grupo 2 y Grupo 3 para los cinco anticuerpos. El producto de cada reacción se ligó en el vector pCR2.1®-TOPO® usando el kit y secuencia de clonación TOPO-TA®.

El listado de oligonucleótidos se diseñó de acuerdo con la bibliografía (Dattamajumdar, A.K., Jacobson, D.P., Hood, L.E. y Osman, G.E. (1991) Rapid cloning of any rearranged mouse immunoglobulin variable genes. Immunogenetics. 43 (3): 141-51; Coloma, M.J., Hastings, A., Wims, L.A. y Morrison, S.L. (1992) Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polimerase chain reaction. J Immunol Methods, 152 (1): 89-104; Coronella, J.A., Telleman, P., Truong, T.D., Ylera, F. y Junghans, R.P. (2000) Amplification of IgG VH and VL (Fab) from single human plasma cells and B cells. Nucleic Acids Res., 28 (20): E85.).

Tabla 6: Listado de oligonucleótidos para la clonación de los dominios variables de cadena pesada de los anticuerpos monoclonales anti-LPA

	Variable	Cadena Pesada	SEQ ID NO:
Grupo 1	MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC	1
	MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	2
	MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT	3
	MHV4	ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRTTT	4
	MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCTT	5
	MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC	6
Grupo 2	MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTMTCTT	7
	MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG	8
	MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG	9
	MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCTG	10
	MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	11
	MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG	12
	MH1:	ATATCCACCA TGGRATGSAG CTGKGT MATS CTCTT	13
	Constante		
	MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	14
	MHCG2a	CAGTGGATAGACCGATGGGGC	15
	MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG	16
	MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC	17
	MVG1R	5'-GGCAGCACTAGTAGGGGCCAGTGGATA-3'	18

Tabla 7: Listado de oligonucleótidos para la clonación de los dominios variables de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales anti-LPA

	Variable	Cadena ligera	SEQ ID NO:
Grupo 1	MLALT1	GGGCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT	19
	MLALT2	GGGCACCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG	20
	MLALT3	GGGCACCATGGAGWCACAKWCTCAGGTCTTTRTA	21
	MLALT4	GGGCACCATGKCCCCWRCTCAGYTYCTKGT	22
	MLALT5	5'-CACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG-3'	23

	Variable	Cadena ligera	SEQ ID NO:
Grupo 2	MKV1a	ATGAAGTTGVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG	24
	MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG	25
	MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG	26
	MKV4	ATGAGGRCCCTGCTCAGWTTYTTGMMWTCTTG	27
	MKV5	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC	28
	MKV6	ATGAGGTKCKKTGKTSAGSTSCTGRGG	29
	MKV7	ATGGGCWTCAGATGGAGTCACAKWYYCWGG	30
	MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTTCAATTG	31
	MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	32
	MKV10	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT	33
	MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	34
	VK8	TGGGTATCTGGTRCSTGTG	35
MKV20	ATGGAGWCAGACACACTSCTG	36	
Grupo 3	CL12A	ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT	37
	CL12B	ATGGAGACACATTCTCAGGTCITTTGT	38
	CL13	ATGGATTCACAGGCCAGGTTCTTAT	39
	CL14	ATGATGAGTCCTGCCAGTTCTCTT	40
	CL15	ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT	41
	CL16	ATGGATTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT	42
	CL17A	ATGAGGTGCCTARCTCAGTTCTGGRG	43
	CL17B	ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG	44
	CL17C	ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG	45
	Constante		
	MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	46
	33615:	5'GAAGATCTAGACTTACTA TGCAGCATCAGC-3'	47

Los clones de TOPO2.1 que contenían las regiones variables de cadena pesada y ligera se secuenciaron y las regiones CDR se determinaron. El dominio variable de la cadena ligera se amplificó a continuación por PCR mediante la adición de una secuencia líder y los sitios de corte sugeridos por Lonza la clonación en el vector de expresión y cadena ligera de Lonza, pCONkappa2 (5' HindIII, 3' BsiWI, secuencia líder de LC: ATG TCT GTG CCT ACC CAG GTG CTG GGA CTG CTG TGG CTG ACA GAC GCC CGC TGT, SEQ ID NO: 48). El dominio variable de la cadena pesada se amplificó a continuación por PCR añadiendo una secuencia líder y los sitios de corte sugeridos por Lonza para clonación en el vector de expresión de cadena pesada de Lonza, pCONgamma1f (5' HindIII, 3' ApaI, secuencia líder de HC: ATG GAA TGG AGC TGG GTG TTC CTG TTC TTT CTG TCC GTG ACC ACA GGC GTG CAT TCT, SEQ ID NO: 49). A continuación, los productos finales se insertaron en vectores de expresión de cadena ligera o pesada, que contenían las regiones constantes, con digestión y ligación con el Kit de Ligación Rápida (Roche).

Los plásmidos de cadena pesada y ligera se transformaron en células bacterianas químicamente competentes One Shot® TOP 10 (Invitrogen) y se preservaron en glicerol. El ADN de plásmido a gran escala se preparó como lo describe el fabricante (Qiagen, kit MAXIPREP™ sin endotoxina). Las muestras de ADN, purificadas usando el Kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen o el Kit EndoFree Plasmid Mega/Maxi, se secuenciaron usando un secuenciador automatizado ABI 3730x1, que también traduce las señales fluorescentes en sus correspondientes secuencias de nucleobases. Los cebadores se diseñaron en los extremos en las posiciones 5' y 3' de modo que la secuencia obtenida se podría superponer.

Amplificación de las regiones variables por PCR

Las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizaron usando el kit de ADN polimerasa Pfx de Invitrogen con tampón 10 x y MgSO₄ 50 mM (n.º de cat 1708-013) y dNTP 10 mM (Invitrogen, n.º de cat 18427-013). La mezcla de reacción consistía en 5 ul de tampón de amplificación pfx 10 x, 1,5 ul de dNTP 10 mM, 1 ul de MgSO₄ 50 mM, 1,5 ul del oligonucleótido 1, 1,5 ul del oligonucleótido 2, 0,5 ul de molde (~50 ng), 0,5 ul de ADN polimerasa de Pfx, 38,5 ul de agua estéril. Se añadieron todos los reactivos menos Pfx y a continuación se añadió Pfx inmediatamente antes de comenzar con el termociclador. Después de desnaturalización de los moldes a 95 °C durante 3 minutos, se realizaron 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, seguido a 58 °C con un gradiente de +/- 5 °C y extensión a 68 °C durante 30 segundos. Después de una extensión final a 68 °C durante 5 minutos, las muestras se mantuvieron a 4 °C.

Digestión de restricción y reacciones de liberación para clonar las regiones variables

Las digestiones de restricción se realizaron en ADN para preparar fragmento para ligación o para que la verificación

de la clonación antes de comprobar la secuencia molecular. Todas las enzimas de restricción se adquirieron en Invitrogen o New England Biolabs que vienen con los correspondientes tampones necesarios para cada enzima. El ADN (normalmente 5-10 ul para comprobar los clones positivos y 20-26 ul para el ADN a ligar) se mezclaron con el tampón enzimático, de 0,5 a 1,0 ul de la enzima de restricción, y agua estéril (hasta un total de 30 ul de reacción).

5 Las reacciones se incubaron a temperatura apropiada para la enzima durante 1 h. La mayoría de las enzimas eran activas a 37 °C, sin embargo, la temperatura de incubación podría variar de temperatura ambiente a 55 °C dependiendo de las enzimas. Después de una digestión con encima de restricción adecuada, el kit GeneClean se usó para limpiar el fragmento insertado y el vector del gel de agarosa y cualquier enzima y tampón. Las ligaciones se realizaron usando el Kit de Ligación Rápida de Roche (n.º de catálogo 11635379001) que incluía tampón de ligación T4 ADN 2 x, tampón de dilución de ADN 5 x, y T4 ADN ligasa. Las inserciones y los vectores se ligaron en una proporción molar final de 3:1 para los mejores resultados. Los fragmentos de inserción se diluyeron de forma apropiada para ligaciones eficaces. Se usaron de 5 ul a 7 ul de la reacción para células químicamente competentes TOP 10 de *E. coli* transformadas.

15 ELISA Cuantitativo

Las placas para microtitulación con ELISA (Costar, n.º de Cat 3361) se revistieron con IgG anti-ratón de conejo, el anticuerpo específico del fragmento F(ab')₂ (Jackson, 315-005-047) diluido en Tampón de Carbonato 1 M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 h. Las placas se lavaron con PBS y se bloquearon con PBS/BSA/Tween-20 durante 1 h a 37 °C. Para la incubación primaria, diluciones de IgG de ratón o IgG humana, molécula completa (usada para curva de calibración) y las muestras a medir se añadieron a los pocillos. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 ul por pocillo de anti-humano conjugado con HRP diluido a 1:50.000 (Jackson 109-035-003) durante 1 h a 37 °C. Después de lavar, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina (Sigma, n.º de Cat T0440) y se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. Los datos sin procesar se transfirieron al software GraphPad para análisis.

ELISA Directo

30 Las placas para microtitulación con ELISA (Costar, n.º de Cat 3361) se revistieron con LPA-BSA diluido en Tampón de Carbonato 1 M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 h. Las placas se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4) y se bloquearon con PBS/BSA/Tween-20 durante 1 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. Las muestras a someter a ensayo se diluyeron a 0,4 ug/ml, 0,2 ug/ml, 0,1 ug/ml, 0,05 ug/ml, 0,0125 ug/ml, y 0 ug/ml y 100 ul añadidas a cada pocillo. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 ul por pocillo de anti-humano conjugado con HRP diluido a 1:50.000 (Jackson 109-035-003) durante 1 h a 37 °C. Después de lavar, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina (Sigma, n.º de Cat T0440) y se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. Los datos sin procesar se transfirieron al software GraphPad para análisis.

Expresión transitoria

40 Los vectores se transfectaron en la línea 293F de células de riñón embrionario humano usando 293fectina y usando Medio 293F-FreeStyle para cultivo. Las transacciones se realizaron a una densidad celular de 10⁶ células/ml con 0,5 µg/ml. Los sobrenadantes se recogieron por centrifugación a 1100 rpm durante 5 minutos a 25 °C, 3 días después de la transfección. El nivel de expresión se cuantificó con ELISA cuantitativo y la unión se midió en un ELISA de unión como se ha descrito anteriormente.

50 Los dominios V_H y V_L de ratón se secuencian usando métodos convencionales. Las Tablas 8-17 muestran las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos para los dominios V_H y V_L de ratón para 5 clones de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón. Para cada secuencia de aminoácidos de CDRH1, la CDR definida de acuerdo con Kabat es la secuencia de 10 aminoácidos mostrada. La parte de cinco aminoácidos de la secuencia de Kabat que se muestra en letra negra esta secuencia canónica de CDRH1.

Tabla 8: Secuencias de ácidos nucleicos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon B3 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
B3	GGAGACGCCTTCACAAATTACTTA ATAGAG	CDRH1	50
B3	CTGATTTATCCTGATAGTGGTTAC ATTAECTACAATGAGAACTTCAA GGGC	CDRH2	51
B3	AGATTTGCTTACTACGGTAGTGCC TACTACTTTGACTAC	CDRH3	52

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
	V _L CDR		
B3	AGATCTAGTCAGAGCCTTCTAAA AACTAATGGAAACACCTATTTAC AT	CDRL1	53
B3	AAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG	CDRL2	54
B3	TCTCAAAGTACACATTTTCCATTC ACG	CDRL3	55

Tabla 9: Secuencias de aminoácidos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon B3 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
B3	GDAFTNYLIE*	CDRH1	56
B3	LIYPDSGYINYENFKG	CDRH2	57
B3	RFAYYGGSGYYFDY	CDRH3	58
	V _L CDR		
B3	RSSQSLLKTNGNTYLH	CDRL1	59
B3	KVSNRFSG	CDRL2	60
B3	SQSTHFPFT	CDRL3	61

*La CDRH1 definida de acuerdo con Kabat es la secuencia de 10 aminoácidos mostrada. La parte de cinco aminoácidos de la secuencia de Kabat mostrada en letra negrita (NYLIE; SEQ ID NO: 62) es la secuencia canónica de CDRH1.

5 Tabla 10: Secuencias de ácidos nucleicos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon B7 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
B7	GGATACGGCTTCATTAATTACT TAATAGAG	CDRH1	63
B7	CTGATTAATCCTGGAAGTGATT ATACTAACTACAATGAGAACT TCAAGGGC	CDRH2	64
B7	AGATTTGGTTACTACGGTAGC GGCAACTACTTTGACTAC	CDRH3	65
	V _L CDR		
B7	ACATCTGGTCAGAGCCTTGTC ACATTAATGGAAACACCTATT TACAT	CDRL1	66
B7	AAAGTTTCCAACCTATTTTCT	CDRL2	67
B7	TCTCAAAGTACACATTTTCCAT TCACG	CDRL3	68

Tabla 11: Secuencias de aminoácidos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon B7 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
B7	GYGF INYLIE *	CDRH1	69
B7	LINPGSDYTNYNENFKG	CDRH2	70
B7	RFGYYGSGNYFDY	CDRH3	71
	V _L CDR		
B7	TSGQSLVHINGNTYLH	CDRL1	72
B7	KVSNLFS	CDRL2	73
B7	SQSTHFPFT	CDRL3	74

*La CDRH1 definida de acuerdo con Kabat es la secuencia de 10 aminoácidos mostrada. La parte de cinco aminoácidos de la secuencia de Kabat mostrada en letra negrita (NYLIE; SEQ ID NO: 62) es la secuencia canónica de CDRH1.

5

Tabla 12: Secuencias de ácidos nucleicos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon B58 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
B58	GGAGACGCCTTCACTAATTACTTGATC GAG	CDRH1	75
B58	CTGATTATTCCTGGAAGTGGTTATACT AACTACAATGAGAAGTCAAGGGC	CDRH2	76
B58	AGATTTGGTTACTACGGTAGTAGCAAC TACTTTGACTAC	CDRH3	77
	V _L CDR		
B58	AGATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGT AATGGAAACACCTATTTACAT	CDRL1	78
B58	AAAGTTTCCAACCGATTTTCT	CDRL2	79
B58	TCTCAAAGTACACATTTTCCATTCCT	CDRL3	80

Tabla 13: Secuencias de aminoácidos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon B58 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
B58	GDAFT NYLIE *	CDRH1	81
B58	LIIPGTGYTNYNENFKG	CDRH2	82
B58	RFGYYGSSNYFDY	CDRH3	83
	V _L CDR		
B58	RSSQSLVHSNGNTYLH	CDRL1	84
B58	KVSNRFS	CDRL2	85
B58	SQSTHFPFT	CDRL3	86

*La CDRH1 definida de acuerdo con Kabat es la secuencia de 10 aminoácidos mostrada. La parte de cinco aminoácidos de la secuencia de Kabat mostrada en letra negrita (NYLIE; SEQ ID NO: 62) es la secuencia canónica de CDRH1.

Tabla 14: Secuencias de ácidos nucleicos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon 3A6 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
3A6	GGAGACGCCTTCACTAATTACTTGATCG AG	CDRH1	87
3A6	CTGATTATTCCTGGAAGTGGTTATACTA ACTACAATGAGAACTTCAAGGGC	CDRH2	88
3A6	AGATTTGGTTACTACGGTAGTGGCTACT ACTTTGACTAC	CDRH3	89
	V _L CDR		
3A6	AGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTA ATGGAAACACCTATTTACAT	CDRL1	90
3A6	AAAGTTTCCAACCGATTTTCT	CDRL2	91
3A6	TCTCAAAGTACACATTTTCCATTCACG	CDRL3	92

5 Tabla 15: Secuencias de aminoácidos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon 3A6 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
3A6	GDAFT NYLIE *	CDRH1	93
3A6	LIIPGTGYTNYNENFKG	CDRH2	94
3A6.	RFGYYGSGYYFDY	CDRH3	95
	V _L CDR		
3A6	RSSQSLVHSNGNTYLH	CDRL1	96
3A6	KVSNRFS	CDRL2	97
3A6	SQSTHFPFT	CDRL3	98

*La CDRH1 definida de acuerdo con Kabat es la secuencia de 10 aminoácidos mostrada. La parte de cinco aminoácidos de la secuencia de Kabat mostrada en letra negrita (NYLIE; SEQ ID NO: 62) es la secuencia canónica de CDRH1.

Tabla 16: Secuencias de ácidos nucleicos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon A63 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
A63	GGCTTCTCCATCACCAGTGGTTACTGGA CC	CDRH1	99
A63	TACATAGGCTACGATGGTAGCAATGACTCC AACCCATCTCTCAAAAAT	CDRH2	100
A63	GCGATGTTGCGGCGAGGATTTGACTAC	CDRH3	101

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
	V _L CDR		
A63	AGTGCCAGCTCAAGTTTAAAGTTACATGCAC	CDRL1	102
A63	GACACATCCAAACTGGCTTCT	CDRL2	103
A63	CATCGGCGGAGTAGTTACACG	CDRL3	104

Tabla 17: Secuencias de aminoácidos de CDR de LPA de ratón de los dominios V_H y V_L de ratón para el clon A63 de anticuerpo monoclonal anti-LPA de ratón

CLON	V _H CDR	CDR	SEQ ID NO:
A63	GFSIT S GYWT*	CDRH1	105
A63	YIGYDGSNDSNP SLKN	CDRH2	106
A63	AMLRRGFDY	CDRH3	107
	V _L CDR		
A63	SASSLSYMH	CDRL1	108
A63	DTSK LAS	CDRL2	109
A63	HRRSSYT	CDRL3	110

*La CDRH1 definida de acuerdo con Kabat es la secuencia de 10 aminoácidos mostrada. La parte de cinco aminoácidos de la secuencia de Kabat mostrada en letra negra (GYWT; SEQ ID NO: 111) es la secuencia canónica de CDRH1.

5 Las Tablas 18-27 muestran secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de anticuerpos anti-LPA de V_H y V_L.

Tabla 18: Secuencias de ácidos nucleicos del clon B3 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de B3	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTGTTCT TTCTGTCCGTGACCACAGGCGTGCATTCTCAGGTCAAGCTGCA GCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAA GGTGTCTGACGGCTTCTGGAGACGCCTTCACAAATTA CTTA ATAGAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGG ATTGGACTGATTTATCCTGATAGTGGTTACATTA ACTACAATG AGAACTTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAGATCCT CCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA CTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAGATTTGCTTACTACGGTA GTGGCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC AGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	112
Cadena Ligera de B3	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGAC TGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCCCGCTGTGATGTTGTGAT GACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAA	113

Secuencia	SEQ ID NO:
GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTCTAAAACTA ATGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCA GTCTCCAAAACCTCTAATCTTCAAAGTTTCCAACCGATTTTCTG GGGTCCCGGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGACT TCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAG TTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTCCATTACGTTTCGGC ACGGGGACAAAATTGAAATAAAACGTACG	

Tabla 19: Secuencias de aminoácidos del clon B3 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de B3	
KLAATMEWSWVFLFLLSVTTGVHSQVKLQQSGPELVRPGTSVKV SCTASGDAFTNYLIEWVKQRPQGQLEWIGLIYPDSGYINYENFK GKATLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRFAYYGSYYF DYWGQGTTLTVSSASTKG	114
Cadena Ligera de B3	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLTARCDVVMQTPLSLPVSLGDQ ASISCRSSQSLLKTNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIFKVSNRFSQVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTGKLEI KRT	115

Tabla 20: Secuencias de ácidos nucleicos del clon B7 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de B7	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTGTTCT TTCTGTCCGTGACCACAGGCGTGATTCTCAGGTCCAACGCA GCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAA GGTGTCTGCAAGGCTTCTGGATACGGCTTCATTAATTACTTA ATAGAGTGGATAAAACAGAGGCTGGACAGGGCCTTGAGTGG ATTGGACTGATTAATCCTGGAAGTGATTATACTAACTACAATG AGAACTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAGTCCT CCAGCACTGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA CTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAGATTTGGTTACTACGGT AGCGGCAACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA CAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	116
Cadena Ligera de B7	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGAC TGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCCCGCTGTGATGTTGTGAT GACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAA GCCTCCATCTCTTGACATCTGGTCAGAGCCTTGTCACATTAA	117

Secuencia	SEQ ID NO:
TGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAG TCTCCAAAGCTCCTCATCTACAAAGTTTCCAACCTATTTTCTGG GGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGT TTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTCCATTACGTTTCGGCA CGGGGACAAAATTGAAAATAAACGTACG	

Tabla 21: Secuencias de aminoácidos del clon B7 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de B7	
KLAATMEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLQQSGAELVSRPGTSVK VSKKASGYGFINYLIEWIKQRPQGLEWIGLINPGSDYTNYNENF KGKATLTADKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYGSGNY FDYWGQGTTLTVSSASTKG	118
Cadena Ligera de B7	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLTDARCDVVMQTPLSLPVSLGDQ ASISCTSGQSLVHINGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNFLSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTGKLEI KRT	119

Tabla 22: Secuencias de ácidos nucleicos del clon B58 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de B58	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTGTTCT TTCTGTCCGTGACCACAGGCGTGCATTCTCAGGTCCAGCTGCA GCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTCAGGCCTGGGACTTCAGTGAA GGTGTCTGCAAGGCTTCTGGAGACGCCTTCACTAATTAATTG ATCGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGG ATTGGACTGATTATTCCTGGAAGTGGTTATACTAACTACAATG AGAAGTCAAGGGCAAGGCAACTGACTGCAGACAAATCCT CCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA CTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAGATTTGGTACTACGGT AGTAGCAACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA CAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	120
Cadena Ligera de B58	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGAC TGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCCCGCTGTGATGTTGTGAT GACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTA ATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCA	121

Secuencia	SEQ ID NO:
GTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTG GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGACCAGGGACAGATT TCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAA TTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTCCATTCACTTTCTGGC ACGGGGACAAAATTGAAATAAAACGTACG	

Tabla 23: Secuencias de aminoácidos del clon B58 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de B58	
KLAATMEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVK VSCKASGDAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGLIIPGTGYTNYNENF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRFGYGYSSNY FDYWGQGTTLTVSSASTKG	122
Cadena Ligera de B58	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLTARCDVVMQTPLSLPVSLGDQ ASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGSV PDRFSGSGPGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHFPFTFGTGKLE IKRT	123

Tabla 24: Secuencias de ácidos nucleicos del clon 3A6 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de 3A6	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTGTTCT TTCTGTCCGTGACCACAGGCGTGCATTCTCAGGTCCAGCTGCA GCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTCAGGCCTGGGACTTCAGTGAA GTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACGCCTTCACTAATTACTTG ATCGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGG ATTGGACTGATTATTCCTGGAAGTGGTTATACTAACTACAATG AGAACTTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAGTCCT CCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA CTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAGATTTGGTACTACGGT AGTGGCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA CAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC	124
Cadena Ligera de 3A6	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGAC TGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCCCGCTGTGATGTTGTGAT GACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGATCAA GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTA ATGGAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCA GTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTG	125

ES 2 585 702 T3

Secuencia	SEQ ID NO:
GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGACCAGGGACAGATT TCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAG TTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTCCATTCACGTTCCGGC ACGGGCACAAAATTGGAAATAAAACGTACG	

Tabla 25: Secuencias de aminoácidos del clon 3A6 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de 3A6	
KLAATMEWSWVFLFVSVTTGVHSQVQLQQSGAELVSRPGTSVKL SCKASGDAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGLIIPGTGYTNYNENFK GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRFGYYGSGYYF DYWGQGTTLTVSSASTKG	126
Cadena Ligera de 3A6	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLTARCDVVMQTPLSLPVSLGDQ ASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGPGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGTGTKL EIKRT	127

Tabla 26: Secuencias de ácidos nucleicos del clon A63 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de A63	
AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTGTTCT TTCTGTCCGTGACCACAGGCGTGCACTTCTGATATACAGCTTCA GGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCT CTCACCTGCTCTGTCACTGGCTTCTCCATCACCAGTGGTTATTA CTGGACCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTG GGTGGCCTACATAGGCTACGATGGTAGCAATGACTCCAACCCA TCTCTCAAAAATCGAATCTCCATCACCCGTGACACATCTAAGA ACCAGTTTTTCTGAAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACAC AGCCACATATTACTGTGCAAGAGCGATGTTGCGGCGAGGATTT GACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCT CCACCAAGGGCCC	128
Cadena Ligera de A63	
AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACCCAGGTGCTGGGAC TGCTGCTGCTGTGGCTGACAGACGCCCGCTGTCAAATTGTTCT CACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAG GTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTTTAAGTTACATGC ACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGA TTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTC AGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTATTCTCTCACAATCAGCA	129

Secuencia	SEQ ID NO:
GCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCATCGGCG GAGTAGTTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA ACGTACG	

Tabla 27: Secuencias de aminoácidos del clon A63 con secuencia líder y sitios de corte añadidos

Secuencia	SEQ ID NO:
Cadena Pesada de A63	
KLAATMEWSWVFLFLLSVTTGVHSDIQLQESGGLVKPSQSLSLT CSVTFGSITSGYYWTWIRQFPGNKLEWVAYIGYDGSNDSNPSLK NRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARAMLRRGFDYWG QGTTTLTVSSASTKG	130
Cadena Ligera de A63	
KLAATMSVPTQVLGLLLLWLTDARCQIVLTQSPAIMSASPGEKVT MTCASSSLSYMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGS GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHRRSSYTFGGGTKLEIKRT	131

EJEMPLO 9 Anticuerpo murino líder de Lpath, Lpathomab™ (LT3000) - visión de conjunto

5 El clon B7 del anticuerpo murino se eligió como el compuesto líder y se renombró Lpathomab™, también conocido como LT3000. Como se ha descrito anteriormente, este mAb anti-LPA murino, se obtuvo a partir de una línea de células de hibridoma después de inmunización de ratones con un inmunógeno de LPA derivatizado a partir de proteína. Una línea de células de hibridoma con propiedades favorables se identificó y se usó para producir un anticuerpo monoclonal usando técnicas convencionales de cultivo de hibridoma.

10 El solicitante ha realizado una serie de estudios completos de eficacia preclínica para confirmar la utilidad terapéutica potencial de un enfoque basado en anticuerpo anti-LPA. Se cree que la neutralización de anticuerpos (por ejemplo, reducción de la concentración eficaz) de LPA extracelular podría dar como resultado una disminución notable en la evolución de la enfermedad en seres humanos. Para el cáncer, la neutralización de LPA podría dar como resultado la inhibición de la proliferación tumoral y la vasculatura crecimiento necesario para apoyar el crecimiento del tumor. Además, algunas investigaciones recientes sugieren que muchos inhibidores de la angiogénesis también pueden actuar como compuestos antimetastásicos y antiinvasivos que también podrían mitigar la propagación del cáncer a sitios alejados del tumor inicial. Para la fibrosis, la neutralización del LPA podría dar como resultado una reducción de la inflamación y fibrosis asociada con la respuesta de curación de heridas anómala después de una lesión tisular. Por lo tanto, Lpathomab™ podría tener varios mecanismos de acción, incluyendo:

- Un efecto directo en el crecimiento, migración, y susceptibilidad tumoral a agentes quimioterapéuticos
- Un efecto indirecto en tumores a través de efectos antiangiogénicos
- Un efecto indirecto adicional en tumores mediante la prevención de la liberación y neutralización de factores de crecimiento proangiogénicos sinérgicos
- Un efecto directo en la proliferación, migración, y transformación de fibroblastos con respecto al fenotipo de miofibroblastos y producción de colágeno por miofibroblastos
- Un efecto indirecto en la fibrosis tisular mediante prevención de la expresión y liberación de factores de crecimiento proangiogénicos, proinflamatorios y profibróticos sinérgicos.

EJEMPLO 10: Propiedades Biofísicas de Lpathomab/LT3000

35 Lpathomab/LT3000 tiene una afinidad elevada hacia la señalización del LPA lipídico (K_D de 1-50 pM); además, LT3000 demuestra una especificidad elevada hacia LPA, habían demostrado que no tiene afinidad de unión con respecto a más de 100 lípidos bioactivos y proteínas diferentes, algunos de los cuales son estructuralmente similares. El anticuerpo murino es un anticuerpo de isotipo IgG1k de longitud completa formado por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas con un peso molecular total de 144 kDa. Las propiedades biofísicas se resumen en la **Tabla 28**.

Tabla 28: Propiedades Generales de Lpathomab (LT3000)

Identidad	LT3000
Isotipo de anticuerpo	IgG1k Murino
especificidad	Ácido lisofosfatídico (LPA)
Peso molecular	155,5 Daltons
DO de 1 mg/ml	1,22 (solución a 280 nm)
K _D	1-50 pM
T _m Aparente	67 °C a pH 7,4
Aspecto	transparentes y se disuelve en tampón de PBS 1x (fosfato 6,6 mM, cloruro sódico 154 mM, pH 7,4)
Solubilidad	> 40 mg/ml en fosfato 6,6 mM, cloruro sódico 154 mM, pH 7,4

La unión potente y específica de Lpathomab/LT3000 a LPA da como resultado una reducción de la disponibilidad del LPA extracelular con efectos potencialmente terapéuticos frente a trastornos relacionados con cáncer, angiogénicos y fibróticos. Algunos estudios seleccionados realizados con Lpathomab/LT3000 se describen en los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 11: Lpathomab™ en Modelos de Cáncer y Angiogénesis

Los efectos pleiotrópicos de LPA sugieren que la reducción de la disponibilidad (concentración eficaz) del LPA extracelular (i) reducirá el crecimiento, metástasis y angiogénesis de tumores primarios y (ii) contrarrestará el efecto antiapoptótico de LPA en el tumor. Debido a la unión potente y específica de Lpathomab™/LT3000 a LPA, los inventores tienen la hipótesis de que el tratamiento de LT3000 *in vivo* en modelos preclínicos de cáncer daría como resultado diversos beneficios terapéuticos.

Se realizaron estudios preclínicos usando una diversidad de sistemas *in vitro* e *in vivo*, lo que demuestra que Lpathomab™/LT3000 (administrado cada 3 días a dosis de 10-50 mg/kg) presenta un perfil de actividad que es coherente con diversos mecanismos de acción, que incluyen:

Inhibición del crecimiento tumoral en una diversidad de modelos de xenoinjerto de tumor humano *in vivo*;
 Reducción de la proliferación celular dependiente de LPA e invasión de líneas de células tumorales y endoteliales humanas *in vitro*;
 Reducción de la angiogénesis tumoral, junto con reducciones en los niveles de circulación de factores de crecimiento tumorigénicos/angiogénicos incluyendo IL6, IL8, GM-CSF, MMP2, y VEGF *in vivo*;
 Reducción del potencial metastásico; y
 Neutralización de la protección inducida por LPA frente a muerte de células tumorales.

En modelos *in vitro*:

Reducción de la proliferación de células de cáncer de ovario OVCAR3;
 Neutralización de la liberación de IL-8, IL-6 y VEGF inducida por LPA de células tumorales Panc-1 (pancreáticas), OVCAR3 y SKOV3 (ovario) *in vitro*;
 Mitigación de los efectos de LPA en la protección de células tumorales SKOV3 y Panc-1 de apoptosis (lo que sugiere un aumento de la eficacia cuando se usa en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales);
 Neutralización de liberación de IL-8, IL-6 y VEGF inducida por LPA de tumor,
 Inhibición de migración de células, proliferación y protección de agentes quimioterapéuticos tumorales inducida por LPA; y
 Neutralización de formación de tubos de células endoteliales inducida por LPA, migración y protección de muerte celular en diversos ensayos *in vitro*.

En modelos *in vivo*:

Inhibición de la progresión de varios tumores humanos ortotópicos y subcutáneos implantados en ratones atímicos; incluyendo SKOV3 (ovario; véase el ejemplo que sigue a continuación), COLO205 (colorrectal; véase el ejemplo que sigue a continuación), DU145 (próstata), B16 F10 (melanoma murino; véase el ejemplo que sigue a continuación), y células de cáncer de pulmón de Lewis (véase el ejemplo que sigue a continuación);
 Reducción espectacular de angiogénesis asociada con tumor en modelos de xenoinjerto de SKOV3 subcutáneo y en células DU145 de cáncer de próstata;
 Neutralización del angiogénesis inducida por bFGF y VEGF en el ensayo de tapón de Matrigel en murino (véase

el ejemplo que sigue a continuación); y

Reducción de la neovascularización coroidea en un modelo de lesión de la membrana de Bruch inducida por láser en el ojo (véase el ejemplo que sigue a continuación).

5 EJEMPLO 12: Eficacia Anti-angiogénica de LT3000 en el Modelo de Matrigel

El LT3000 administrado a q2d por inyección intraperitoneal (IP) mitiga la vascularización inducida por FGF y VEGF de tapones de Matrigel implantados en ratones C57BL/6 hembra. Este estudio se realizó en el Southern Research Institute (Birmingham, AL).

10 **Objetivo.** Determinar la eficacia antiangiogénica de LT3000 para retrasar la vascularización de tapones de Matrigel suplementados con FGF y VEGF implantados en ratones C57/BL6 hembra.

15 **Diseño del estudio.** Matrigel solo o suplementado con bFGF o VEGF (N = 5 ratones/grupo de tratamiento) se inyectó por vía subcutánea (SC) en el costado de cada ratón. Un día antes del implante del tapón de Matrigel, el tratamiento con 10 mg/kg de LT3000 o solución salina comenzó mediante administración IP. Los tratamientos se administraron cada dos días (q2d). Después del sacrificio, los tapones de Matrigel se recogieron y se procesaron para análisis de densidad microvascular (MVD) mediante tinción con CD-31.

20 **Resultados.** La densidad intravascular se redujo en aproximadamente un 41 % en tapones suplementados con bFGF y VEGF en ratones tratados con LT3000 cuando se compara con ratones tratados con solución salina. Esta reducción era estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) y se confirmó de forma histológica mediante tinción con CD31.

25 **Conclusión.** Este estudio muestra que la eficacia antiangiogénica de LT3000 administrado por vía sistémica daba como resultado una disminución significativa de la neovascularización de los tapones de Matrigel suplementados con bFGF y VEGF.

30 EJEMPLO 13: Eficacia Anti-angiogénica de LT3000 en el Modelo de CNV

El LT3000 administrado mediante inyección intravítrea redujo la neovascularización coroidea en un modelo de lesión de la membrana de Bruch inducida por láser en ratones C57BL/6 hembra. Este estudio se realizó en la Universidad de Florida, Gainesville (laboratorio de Maria Grant, M.D.).

35 **Objetivo.** Investigar la eficacia de LT3000 para limitar la formación de nuevos vasos sanguíneos en la vasculatura coroidea.

40 **Diseño del estudio.** Los ratones se sometieron a rupturas de la membrana de Bruch inducidas por láser. Los ratones se trataron con 0,5 µg del anticuerpo anti-LPA, LT3000, 0,5 µg de un anticuerpo monoclonal no específico emparejado por isotipos (NSA) o un volumen igual de solución salina.

45 Los tratamientos se administraron mediante inyección intravítrea después de la rotura con láser y una vez a la semana (q7d) para la duración del estudio. De dos a cuatro semanas después de la rotura de la membrana de Bruch, los ratones sacrificaron y sus ojos extrajeron. El complejo de RPE-coroideas-esclerótico se aisló de la retina neuronal y se hizo tinción con aglutinina I de *R. communis* conjugada con rodamina para evaluar la CNV. Todas las determinaciones se realizaron para 2 a 3 quemaduras por animal.

50 **Resultados.** La vascularización de las lesiones CNV se redujo from 2185014 ± 377010 (volumen de CNV medio \pm ETM) con respecto a 697924 ± 92182 en ratones tratados con LT3000 ($n = 5$) cuando se comparaba con ratones tratados con NSA ($n = 4$). Se trata de una reducción de un 68 % en los ratones tratados con LT3000 en comparación con los ratones tratados con NSA ($p \leq 0,05$).

55 **Conclusión.** Este estudio muestra que la administración intravítrea de anticuerpo anti-LPA reducía de forma significativa la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido coroideo como respuesta a la lesión.

60 EJEMPLO 14: Eficacia anti-tumorigénica de LT3000

Los estudios en modelos de xenoinjerto de tumor humano múltiple y modelos singeneicos en roedor demostraron que LT3000 presenta actividad antitumorigénica.

65 Cáncer de Ovario SKOV3 Humano

El LT3000 administrado mediante inyección IP (10 mg/kg q3d) inhibía en gran medida la progresión tumoral en un modelo de tumor de ovario SKOV3 ortotópico en ratones Ncr atímicos. Este estudio se realizó en Lpath.

Objetivo. Determinar la eficacia de LT3000 para bloquear la progresión de tumores de ovario (SKOV3) humano

insertados en la cavidad abdominal de ratones desnudos atímicos hembra.

Diseño del estudio. Los ratones desnudos se injertaron con células tumorales SKOV3 en su cavidad peritoneal. Una vez que los tumores establecieron, los ratones se trataron, en una base IP, con cualquiera de 10 mg/kg de LT3000 q3d, PBS (vehículo) q3d, o 15 mg/kg de paclitaxel diariamente durante 4 días (Taxol). En el momento de la terminación del estudio del día 52, el suero y los fluidos ascíticos se recogieron y se analizaron para niveles de citoquina. Los tumores se extrajeron y los pesos tumorales finales se determinaron.

Resultados. Este estudio demuestra la capacidad de LT3000 para reducir la progresión de tumores SKOV3 (Tabla 29). 10 mg/kg de LT3000 inducían reducciones estadísticamente significativas en la carga tumoral (50 %). Como se ha anticipado, los animales tratados con paclitaxel presentaban una reducción grande (88 %) en la carga tumoral en comparación con los animales tratados con PBS. En este experimento, unos pocos animales en el grupo de LT3000 presentaban fluido ascítico en la cavidad peritoneal (6/14) que el que presentaban los animales en el grupo de control con PBS (11/13). También se producía una reducción estadísticamente significativa en el volumen de acumulación de ascitis en el grupo de LT3000 en comparación con los animales tratados con PBS. Además, LT3000 inducía una disminución de la concentración en suero de las citoquinas proangiogénicas, IL-8, IL-6, GM-CSF y VEGF en comparación con animales tratados con vehículo. Por último, LT3000 reducía la cantidad total de MMP2 (humano y murino) en ascitis. Las secciones de tumores seleccionadas teñidas con H&E y CD31 fueron analizadas por un patólogo certificado. Se produjo una reducción en la interrupción del tejido (epiplón, músculo esquelético y ganglios linfáticos) y una reducción de la densidad de los microvasos en el grupo tratado con LT3000.

Conclusión. El estudio muestra que la administración sistemática de anticuerpo anti-LPA da como resultado una inhibición significativa de la progresión del tumor SKOV3.

Tabla 29: Resumen numérico de hallazgos para el modelo de SKOV3 murino para evaluar la actividad antitumorigénica de LT3000

Análisis #	PBS	mAb LT3000 10 mg/kg	Paclitaxel
Carga tumoral (mg)	1510,1 ± 94,9	761,0 ± 81,9***	185,9 ± 21,7***
% de Reducción	nd	49,6	87,7
Presencia de ascitis	11/13	6/14	0/14
Volumen de ascitis (ml)	1336,2 ± 428,5	31,1 ± 12,9	#
IL-8-ascitis (pg/ml)	2368,4 ± 346,3	611,5 ± 121,2**	#
IL-6-ascitis (pg/ml)	368,0 ± 48,3	145,7 ± 31,0*	#
GM-CSF-ascitis (pg/ml)	80,2 ± 10,5	19,0 ± 6,0**	#
VEGF-ascitis (pg/ml)	5441,1 ± 662,3	3521,7 ± 768,9	#
MMP2-ascitis (pg/ml)	980,1 ± 37,6	418,1 ± 82,6***	#
IL-8 -plasma (pg/ml)	1516,9 ± 179,7	423,6 ± 67,8**	7,1 ± 2,2***
IL-6 -plasma (pg/ml)	72,5 ± 13,2	16,6 ± 3,7*	2,0 ± 0**
GM-CSF-plasma (pg/ml)	34,5 ± 6,9	8,3 ± 1,7*	2,5 ± 0,27**
VEGF en plasma (pg/ml)	15,3 ± 2,3	14,5 ± 1,5	13,0 ± 0,0
MMP2-plasma (pg/ml)	231,6 ± 15,3	230,0 ± 10,9	170,3 ± 6,4*

Media ± ETM

Sin ascitis presente en animales de ensayo

*** p ≤ 0,001; ** p ≤ 0,01; * p ≤ 0,05

B. Modelo de Metástasis de Cáncer de Pulmón de Lewis Humano

El LT3000 administrado mediante inyección IP (20 mg/kg q3d) inhibía en gran medida la progresión tumoral en un modelo de tumor de pulmón de Lewis intravenoso en ratones desnudos. Este estudio se realizó en Lpath.

Objetivo. Se ha mostrado que LT3000 disminuye la migración de células tumorales *in vitro* y reduce de forma significativa la infiltración de células endoteliales y la angiogénesis *in vivo*. El objetivo de este estudio era determinar la eficacia de LT3000 para retardar la metástasis de tumores en los pulmones de ratones Ncr (nu/nu) hembra inoculados por vía intravenosa (IV) con células de carcinoma de pulmón de Lewis.

Diseño del estudio. Los ratones desnudos se inocularon por IV con células de carcinoma de pulmón de Lewis para sembrar los pulmones e iniciar los tumores. El tratamiento con 20 mg/kg de LT3000 o vehículo (solución salina) comenzó el mismo día. Los ratones se trataron q3d hasta que el estudio terminó el día 19. Al final del estudio, los

animales que sobrevivieron se sacrificaron, los pesos corporales y los pesos del pulmón (como una medida de la carga tumoral) se registraron.

Resultados. Los resultados se expresaron como la proporción de peso de pulmón con respecto al peso corporal (LW/BW). La carga tumoral se redujo en un 26,5 % y el peso corporal era un 16,5 % más elevado en los animales tratados con LT3000 en comparación con los controles de solución salina. La proporción de LW/BW en los animales tratados con LT3000 era un 36,5 % menor que la de los controles con solución salina (Tabla 30). El análisis de estos datos demuestra una diferencia significativa en peso del pulmón, proporción de LW/BW, y peso corporal entre los ratones tratados con LT3000 y los controles inyectados solamente con solución salina.

Conclusión. Este estudio muestra que la administración sistémica de anticuerpo anti-LPA da como resultado una disminución de la carga de tumor de pulmón, un aumento del peso corporal y una disminución de la proporción de LW/BW.

Tabla 30: Resumen numérico de hallazgos para el modelo de Pulmón de Lewis Murino para evaluar la actividad antitumorígenica de LT3000

Análisis	Solución Salina *	LT3000 *
Peso del Pulmón (mg)	768,8 ± 139,2 (n = 6)	565,4 ± 153,6 (n = 7)
Peso Corporal (g)	15,8 ± 1,2 (n = 6)	18,4 ± 1,7(n = 7)
Proporción (LW/BW)	49,4 ± 11,8 (n = 6)	31,4 ± 11,9 (n = 7)

* Media ± DT. [p < 0,05]

C. Cáncer Colorrectal COLO205 Humano

El LT3000 administrado mediante inyección IP (30 mg/kg q3d) inhibía la progresión tumoral en un xenoinjerto de tumor COLO205 (colorrectal) subcutáneo en ratones Ncr desnudos. Este estudio se realizó en el Southern Research Institute (Birmingham, AL).

Objetivo. Determinar la eficacia de LT3000 solo para retardar la progresión de tumores de carcinoma colorrectal (COLO205) humano insertados por vía subcutánea (sc) y establecidos en ratones Ncr (nu/nu) hembra.

Diseño del estudio. Los ratones desnudos se injertaron por sc con fragmentos de tumor COLO205 y se permitió que los tumores se establecieran. Los ratones se trataron a continuación con cualquiera de 30 mg/kg de LT3000, 40 mg/kg de Avastin™, 15 mg/kg de Paclitaxel™ o vehículo (solución salina). El LT3000 se administró cada tres días (q3d) mediante inyección IP, el Avastin™ se administró cada 7 días (q7d) y el Paclitaxel se administró cada día durante 5 días (q1dx5) mediante inyección ip. Durante el transcurso del estudio, el crecimiento del tumor se controló por medición de los tumores sc en tres ejes y calculando el peso.

Resultados. El LT3000 inhibía de forma significativa (p < 0,012) la progresión tumoral en un 24 % cuando se comparaba con tumores de animales tratados con solución salina. Al final del estudio, el LT3000 era tan eficaz como Avastin (p < 0,002) en la reducción de los pesos del tumor final (una reducción de un 24 % con respecto a un 32 %, respectivamente). El control positivo, Paclitaxel, eliminaba los tumores establecidos previamente.

Conclusión. El estudio sugiere que la administración sistémica de anticuerpo anti-LPA puede inhibir la progresión del tumor de células tumorales COLO205.

Tabla 31: Resumen numérico de hallazgos para el modelo de xenoinjerto de COLO205 murino para evaluar la actividad antitumorígenica de LT3000

Análisis	Peso tumoral medio (mg) ± DT	Significancia (valor p)	% de Reducción en comparación con Ratones Tratados con Vehículo
Vehículo	2378,5 ± 422,2 (n = 8)	N/D	N/D
LT3000	1808,1 ± 338,2 (n = 7)	0,012	24,0

*Media ± DT. [p < 0,012]

D. Modelo de Metástasis de Melanoma por Aloinjerto

Este modelo midió la respuesta de ratones C56B1/6 con melanoma murino al tratamiento con 50 mg/kg de LT3000 solo administrado q3d mediante inyección intraperitoneal. Este estudio se realizó en Lpath.

Objetivo. Determinar la eficacia de LT3000 para reducir la progresión de metástasis pulmonar inducido por la línea de células de melanoma murino, B16-F10.

Diseño del estudio. A los ratones C57BL/6 se les inyectó una suspensión de células tumorales B16-F10 por vía intravenosa (IV) a través de la vena de la cola. Después de clasificación al azar, los animales se dividieron en dos grupos y se trataron con vehículo (solución salina) o 10 mg/kg de LT3000 administrados por vía IP q3d, comenzando el día de la inoculación. Después de 20 días, los animales se sacrificaron, se recogieron muestras de plasma mediante punción cardíaca y los pulmones se aislaron. Los pesos finales del pulmón se determinaron y se correlacionaron con los pesos corporales. Además, la calidad peritoneal y algunos órganos (hígado, estómago, ovarios, intestinos, etc.) de cada animal también se analizaron para la presencia de focos metastásicos.

Resultados. El volumen de metástasis en los pulmones se redujo en un 27 % en los ratones tratados con LT3000 con respecto a los ratones tratados con solución salina, como se muestra en la Tabla 32.

Conclusión. El estudio muestra que la administración sistémica de anticuerpo anti-LPA puede dar como resultado la reducción de metástasis pulmonar de B16-F10.

Tabla 32: Resumen numérico de hallazgos del modelo de melanoma murino para evaluar la actividad antimetastásica de LT3000

Análisis	Ratones Tratados con Solución Salina*	Ratones Tratados con LT3000*	Porcentaje de Reducción
Índice Pulmonar	67,00 ± 4,35	48,57 ± 6,44	27,5 %
Peso del pulmón (mg)/peso corporal (g)	(n = 11)	(n = 9) [†]	

*Media ± DT.
[p < 0,002]

EJEMPLO 15: Actividad anti-fibrosis de Lpathomab (LT3000) en fibroblastos de pulmón

Cultivo Celular y Reactivos. Los fibroblastos de pulmón humano WI-38 se adquirieron en la ATCC (Manassas, VA.). Los fibroblastos de pulmón se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5 % en mínimo medio esencial suplementado con suero bovina fetal al 10 % (FBS) y Penicilina/Estreptomicina (100 unidades/ml). Los anticuerpos de actina de músculo liso alfa (α-SMA) y FAK Y397 se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO). El LPA se adquirió en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL.) y se preparó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

PCR. Las células procedentes de un solo matraz T150, confluyente se retiraron usando tripsina, se sedimentaron por centrifugación y se congelaron a -80 °C para aislamiento de ARN. El aislamiento de ARN total se realizó usando el Kit de Qiagen RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo el protocolo del fabricante para aislamiento de ARN total en células animales. En resumen, se usaron dos microgramos de ARN total para preparar una primera hebra de ADNc usando el Sistema de Síntesis de Primera Hebra Superscript III para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante usando hexámeros aleatorios como el primer cebador de la hebra. Se amplificaron dos microlitros de la primera hebra de ADNc usando oligonucleótidos para receptores de LPA₁₋₃ y el GAPDH fue un control en cada reacción. La PCR se creó usando ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen; Carlsbad, CA). Los productos de PCR se desarrollaron a continuación en un gel de agarosa al 1 % y se formaron imágenes usando Cuarto Oscuro EpiChem³ UVP Biolmaging Systems con filtro de bromuro de etidio (UVP Inc. Upland, CA).

Proliferación celular, producción de colágeno y expresión de α-SMA mediante ELISA basado en células. Los fibroblastos de pulmón se sembraron durante una noche en placas de 96 pocillos a una densidad de 5 x 10³ células/pocillo. Las células sembradas en placas se privaron de suero durante 48 h en medio basal (Medio Esencial Mínimo/BSA sin ácidos grasos al 0,1 %/100 unidades/ml de penicilina y estreptomicina) y a continuación se estimularon durante 72 h con medio basal solo (control) o que contenía las concentraciones indicadas de LPA. La proliferación celular se evaluó usando el ensayo de proliferación celular Cell Titer 96 Aqueous (Promega, Madison, WI.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La absorbancia se midió a DO₄₅₀ y los datos se expresan como el índice de cambio con respecto al control. Las mediciones de absorbancia se realizaron por cuadruplicado. Para la producción de colágeno, la concentración de Propéptido C-Terminal de Colágeno de Tipo I (PICP) en el medio acondicionado se midió con un kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de PICP (ELISA), de acuerdo con el protocolo del fabricante (TaKaRa Biochemicals Co., Osaka, Japón). Para expresión de α-SMA, se realizó un ELISA basado en células como se ha descrito anteriormente {Micera, 2005 n.º 8093} con las siguientes modificaciones. Las células se fijaron en formalina al 10 % tamponada neutra, se permeabilizaron con PBS/ Triton X-100 al 0,1 % y las peroxididas endógenas se inactivaron con H₂O₂ al 0,3 %. La monocapa celular se bloqueó usando PBS/FBS al 10 % y a continuación el anticuerpo primario para α-SMA se diluyó en PBS/BSA al 1 %/Tween 20 al 0,1 % (dilución a 1:1000) y se incubó con células durante una noche a 4 °C. Después de la incubación del anticuerpo primario, las placas se lavaron 3 veces con de PBS/Tween al 0,1 % y se incubaron con el anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP, diluido en PBS/BSA al 1 %/Tween 20 al 0,1 % (dilución a 1:1000), durante 1 h

a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4 veces con PBS y se incubaron con solución colorimétrica de TMB durante 1-3 min. La reacción se detuvo usando un volumen igual de H₂SO₄ 1 M y las absorbancias se leyeron en un lector de placas a 450 nm. Todo, proliferación celular, producción de colágeno y ensayos de expresión α -SMA, se realizaron por triplicado.

5 **Migración celular.** Los fibroblastos de pulmón se sembraron durante una noche en placas de 96 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo. Las células sembradas en placas se sincronizarán durante 24 h en medio basal (Medio Esencial Mínimo/BSA sin ácidos grasos al 0,1 %/100 unidades/ml de penicilina y estreptomycin). En el tiempo 0, las células se rasparon con la punta de una pipeta p200 hacia el centro de cada pocillo, se lavaron con medio mínimo y se tomaron imágenes antes del tratamiento. Las células se trataron a continuación con LPA (C18:1) a concentraciones 0,1-10 μ M o control positivo (FBS al 10 %). Las células se estimularon durante 17 horas a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5 %. De nuevo se tomaron imágenes a las 17 horas después del tratamiento y el % del cierre de la herida se midió mediante el ajuste de las imágenes al mismo tamaño y medición del ancho del raspado en el tiempo 0 y el tiempo 17 h con una regla.

15 **Expresión del receptor LPA₁₋₃ y en fibroblastos de pulmón.** El análisis de RT-PCR de fibroblastos de pulmón reveló una expresión importante de receptores LPA₁₋₃, con los receptores LPA₁ y LPA₃ siendo los más altamente expresados.

20 **LPA estimula la proliferación y la migración por fibroblastos de pulmón.** LPA está implicado en la regulación de la curación de heridas. Por lo tanto los efectos dependientes de LPA de la dosis sobre la proliferación y la migración de fibroblastos, dos mecanismos celulares que contribuyen a la reparación de heridas, se examinaron. El LPA estimuló la proliferación de fibroblastos de una manera dependiente de la dosis con un aumento máximo con LPA 10 μ M. Los efectos de LPA en la migración celular también se investigaron usando un ensayo de curación de heridas *in vitro*. A diferencia del aumento de la proliferación celular dependiente de la dosis, LPA parecía estimular la migración celular a la concentración baja de LPA (0,1 μ M). Al aumentar las concentraciones de LPA, se observaba una reducción de retromigración celular dependiente de la dosis de nuevo a niveles basales. Estos datos sugieren que existe una relación inversa entre los efectos dependientes de la concentración de proliferación y migración de LPA de fibroblastos de pulmón.

30 **LPA estimula la transformación de miofibroblastos y producción de colágeno de tipo I por fibroblastos de pulmón.**

35 Para evaluar el potencial profibrótico de LPA en el pulmón, la estimulación mediada por LPA de la transformación de miofibroblastos y la producción de colágeno de tipo I por los fibroblastos de pulmón se examinó usando ELISA e inmunohistoquímica. El LPA estimuló la expresión de α -SMA (marcador de miofibroblastos) y la liberación de péptido C-terminal de tipo I pro-colágeno (PICP) en una manera dependiente de la dosis dando como resultado una estimulación máxima a la concentración de LPA 10 μ M. Además, LPA aumentaba la incorporación de α -SMA en las fibras de tensión del citoesqueleto y estimulaba la fosforilación de quinasa de adhesión focal (FAK^{Y397}), sucesos que son necesarios para la transformación de miofibroblastos. De forma coherente, estas células transformadas también presentaban aumento de la expresión celular de colágeno de tipo I después de la estimulación con LPA, lo que es indicativo de su transformación al fenotipo celular profibrótico.

EJEMPLO 16: LT3000 reduce la inflamación y la fibrosis después de una lesión con bleomicina en animales

45 **Animales.** Los ratones C57BL/6J hembra, 20-25 g, se obtuvieron en Harlan. Los animales se trataron de acuerdo con el Bioquant (San Diego, CA) Institutional Animal Care and Use Committe (IACUC). Los animales se alojaron en una habitación con aire acondicionado con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h ciclo y les suministró comida convencional con acceso libre a agua corriente. A los animales se les proporcionó acceso *ad libitum* a comida normal (tratada en autoclave) y agua.

50 **Inducción de Lesión Pulmonar con Bleomicina.** Los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina (20 mg/kg) y xilazina (2 mg/kg) y recibieron una única instilación intratraqueal (volumen de 50 μ l) de solución salina (0,9 %) sola o con bleomicina (2,5 mg/kg) a través de una aguja de alimentación de calibre 20. Los ratones se sacrificaron 14 días más tarde.

60 **Grupos experimentales.** Los ratones se clasificaron al azar en los siguientes grupos de tratamiento, (i) mayo su inicial solución salina. Los ratones se sometieron a instilación intratraqueal (IT) de solución salina y decidieron inyección i.p. de PBS estéril (vehículo). (ii) Grupo de BLEO. Los ratones se sometieron a instilación de bleomicina y recibieron inyección i.p. de PBS estéril (vehículo). (iii) Grupo de BLEO + 25 mg/kg. Los ratones se sometieron a instilación IT de bleomicina y recibieron inyección i.p. de LT3000 (25 mg/kg). (iv) Grupo de 25 mg/kg. Los ratones se sometieron a instilación TI de solución salina y recibieron inyección i.p. de LT3000 (25 mg/kg). Todos los tratamientos con anticuerpo se administraron a través de inyección intraperitoneal (i.p.) cada 2 días. Los efectos de cada tratamiento sobre el peso corporal y la mortalidad del ratón se registraron durante el periodo de estudio.

65

Aislamiento de Fluido de Lavado Broncoalveolar (BALF). Los ratones se sacrificaron y los ratones se intubaron con un angiocatéter de calibre 20 unido a una jeringa de 1 ml. El catéter se aseguró en su lugar usando hilo de nailon atado alrededor de la tráquea. Los pulmones se lavaron una vez con 1,0 ml de solución salina y a continuación de nuevo con 0,8 ml de solución salina. Los lavados se combinaron y el BALF se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm. El sobrenadante se retiró y se congeló a -80 °C para su análisis posterior. El sedimento se volvió a suspender en 0,3 ml de PBS/suero bovino fetal al 2 % y las células se clasificaron y se hizo recuento mediante citometría de flujo. Los niveles de proteína en el BALF se evaluaron usando el reactivo de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL.).

Análisis de Células BALF mediante Citometría de Flujo. Las poblaciones individuales de células inflamatorias se identificaron y cuantificaron usando tubos Trucount (BD Biosciences, n.º de cat 340334) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, una suspensión de una sola célula se preparó con tampón de tinción (PBS/FCS al 2 %). Aproximadamente 300 µl de la suspensión celular se colocaron en 12 x 75 tubos de polipropileno Trucount. Los tubos se centrifugaron a 250-300 x g durante 5 minutos a 4 °C. El líquido se aspiró usando una pipeta, teniendo cuidado de no alterar el sedimento. Los siguientes anticuerpos monoclonales se añadieron a continuación a cada tubo: anti-CD16 conjugado con PE (BD Biosciences n.º de cat 555407), anti-CD14 conjugado con FITC (BD Biosciences n.º de cat 555397), y anti-CD5 conjugado con PE-Cy5 (BD Biosciences n.º de cat 555354) para producir un cóctel de tres colores. La cantidad de anticuerpo la proporcionó el fabricante. Los tubos se sometieron a agitación vorticial y se mantuvieron en hielo en un cubo cubierto (en la oscuridad) durante aproximadamente 30 minutos. La suspensión se lavó mediante la adición de 2 ml de tampón de tinción. La suspensión se sometió a agitación vorticial y a continuación se centrifugó a 250-300 x g durante 5 minutos a 4 °C para retirar el sobrenadante. La etapa 6 se repitió 2 veces. El sedimento se volvió a suspender a continuación en 1 ml de tampón de tinción y las poblaciones de células individuales se analizaron mediante análisis de Clasificación Celular Activado por Fluorescencia (FACS). Para el análisis de FACS, las células teñidas se analizaron por citometría de flujo usando BD FACScan (San Jose, CA) con 1 láser (láser de argón a 488 nm) y 3 detectores. Se recogieron 10.000 células, y los datos se analizaron con la versión 3.3 del software CellQuest.

Examen histológico. Los pulmones se extirparon, se separaron en lóbulos individuales y se fijaron durante una noche en formalina tamponada al 10 % a temperatura ambiente. Los lóbulos individuales se cortaron en 3 secciones horizontales y se embebieron en parafina. Los lóbulos se seccionaron hasta un espesor de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Todas las secciones se estudiaron con microscopía de luz (aumento de 10x) y la gravedad de la fibrosis se evaluó de forma semicuantitativa siguiendo los métodos de Ashcroft, como se ha descrito anteriormente (Ashcroft *et al.*, (1988) *J Clin Pathol* 41: 467-70). En resumen, la gravedad de la fibrosis en las secciones horizontales de cada lóbulo se clasificó en una escala de 0 a 8. La clasificación es como sigue a continuación: grado 0, pulmón normal; grado 1, engrosamiento fibroso mínimo de las paredes alveolar o bronquial; grado 3, engrosamiento moderado de las paredes sin daños evidentes en la arquitectura pulmonar; grado 5, aumento de fibrosis con daño definido en la estructura pulmonar y formación de bandas fibrosas o pequeñas masas fibrosas; grado 7, deformación grave de estructura y áreas fibrosas grandes; y grado 8, anulación fibrosa total de los campos. Se hizo un promedio de los valores para las diferentes secciones de cada lóbulo y a continuación se hizo un promedio de todos los para proporcionar una puntuación de fibrosis representativa para cada animal.

Inmunohistoquímica. Las secciones de pulmón se deparafinizaron en 3 lavados de Xileno (Richard Allen Scientific, N.º de Cat 9900) durante 5 minutos cada uno. La rehidratación de los portaobjetos se realizó mediante una serie de lavados en alcoholes de 5 min cada uno: alcohol al 100 % (Richard Allen Scientific, N.º de Cat 8101), alcohol al 95 % (Richard Allen Scientific, N.º de Cat 8201), y alcohol al 80 % (Richard Allen Scientific, N.º de Cat 8301R). La rehidratación se completó mediante el lavado de dos portaobjetos en agua corriente durante 5 minutos. A continuación, las peroxidasa exógenas se inactivaron durante 13 minutos en H₂O₂ al 3 % (30 % diluida en agua, Sigma, N.º de Cat H1009). El H₂O₂ se retiró por lavado de los portaobjetos en agua corriente durante 15 minutos. Mientras tanto, el Tampón de Citrato (Ácido Cítrico 10 mM, pH 6,0 (Fisher, N.º de Cat A940 se calentó previamente a 95 °C en una olla de vapor (Black y Decker, SKU n.º HS900) durante 40 min. Para la recuperación de antígenos, los portaobjetos se transfirieron a Tampón de Citrato calentado previamente y se calentó durante 35 minutos a 95 °C en una olla de vapor. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron dos veces durante 5 min en PBS (Cellgro, N.º de Cat 21-040-CM). Los portaobjeto se tiñeron para actina de músculo liso α (α-SMA) o factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) usando el Kit ABC de Vectastain de IgG de ratón (Vector, N.º de Cat 6102) o el Kit ABC de Vectastain de IgG de Cabra (Vector, N.º de Cat PK-6105) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para todas las etapas que requieren un tampón, se usó PBS. Se usó Kit de Bloqueo de Avidina/Biotina (Vector, N.º de Cat SP-2001) en conjunto con el Kit ABC para bloquear las señales de biotina endógena de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Los anticuerpos primarios dirigidos frente a Actina de Músculo Liso α (Sigma, N.º de Cat A2547) diluidos a 1:5000 o anticuerpo primario dirigido frente a CTGC (Santa Cruz Biotechnology, N.º de Cat sc-14939) diluido a 1:50 se aplicaron como se indica. La señal se detectó usando el Kit DAB de Sustrato de Peroxidasa (Vector, N.º de Cat SK-4100) preparado según lo indica el fabricante y se aplicó a los portaobjetos durante 2 min. Los portaobjetos se lavaron en diH₂O. La tinción con contraste se realizó a través de tinción con hematoxilina (Sigma, N.º de Cat HHS32) durante 30 s. Los portaobjetos se lavaron con agua corriente para eliminar la Hematoxilina y a continuación se deshidrataron invirtiendo el alcohol a xilenos usados para hidratarlos originalmente. Por último, los portaobjetos se montaron con cubreobjetos de vidrio usando 20 µl de Permount (Fisher, n.º de cat SP15-100) por portaobjeto.

Análisis de datos. El estudio se realiza con ocultación completa a todos los que recogían y analizaban los datos hasta que hubieran finalizado todos los datos. Los datos se analizaron usando el software GraphPad. La significación estadística de las diferencias entre grupos experimentales se calculó mediante el ensayo de t de Student para muestras no relacionadas.

Resultados

LT3000 reduce inflamación y fibrosis después de lesión con bleomicina.

Usando el modelo murino de bleomicina, los inventores examinaron el papel de LPA en inflamación y fibrosis pulmonar después de lesión pulmonar y la eficacia de un nuevo anticuerpo de LPA de ratón monoclonal (LT3000) para aliviar estos efectos. El examen histológico de los pulmones de ratón después de instilación de bleomicina reveló un daño significativo el tejido pulmonar, incluyendo engrosamiento de los tabiques alveolares, neumonitis y anulación fibrosa del parénquima pulmonar. En ratones tratados con LT3000 se producía una reducción radical de inflamación y fibrosis y mantenimiento de morfología pulmonar normal. El análisis semicuantitativo de inflamación y fibrosis pulmonar en estos ratones revelaba una reducción de un 56 % y un 48 %, respectivamente, en estos parámetros como resultado del tratamiento con LT3000. No se observó inflamación, fibrosis o cambios en la morfología pulmonar normal en ratones sanos tratados con LT3000 solo.

LT3000 reduce la celularidad y niveles de proteína en fluido de BAL y mantiene el peso corporal de los ratones después de lesión pulmonar con bleomicina. De forma coherente con el grado de lesión tisular, el número de células inflamatorias era casi el doble desde los controles y la cantidad de proteína en el fluido de BAL de ratones instilados con bleomicina aumentaba de forma significativa en aproximadamente diez veces. La administración de LT3000 redujo la celularidad del fluido de BAL en aproximadamente un 95 %, en ratones tratados tanto con control como con bleomicina. Además, los niveles de proteína en el fluido de BAL disminuyeron en un 40 % en ratones instilados con bleomicina que recibieron LT3000. De forma coherente con el grado de lesión pulmonar, se observó una reducción de un 16 % en ratones instilados con bleomicina, en comparación con ratones de control en el punto temporal de 14 días. Por el contrario, los pesos corporales de los ratones instilados con bleomicina que fueron tratados con LT3000 no se diferenciaban de forma significativa de los controles.

LT3000 disminuye la densidad de macrófagos y miofibroblastos en tejido pulmonar después de lesión con bleomicina. Para investigar adicionalmente la capacidad de LT3000 para reducir la inflamación y la fibrosis pulmonar, los inventores examinaron la infiltración de macrófagos y la densidad de miofibroblastos en tejido de pulmón de ratón. Del mismo modo, la densidad de los miofibroblastos, como se indica mediante tinción con α -SMA, aumento en el área fibrótica de ratones instilados con bleomicina. El tratamiento con LT3000 también disminuye la densidad de miofibroblastos, en los pulmones de ratones instilados con bleomicina. Los efectos en la fibrosis e inflamación pulmonar se confirmaron siguiendo clasificación semicuantitativa de fibrosis pulmonar (puntuación de Ashcroft) e inflamación (puntuación inflamatoria) usando métodos descritos anteriormente. El tratamiento con LT3000 redujo la fibrosis y la inflamación pulmonar en un 48 % y un 56 %, respectivamente.

EJEMPLO 17: LT3000 reduce inflamación y fibrosis después de lesión con bleomicina en un estudio de intervención.

Los hallazgos resaltados en los ejemplos anteriores demostraban efectos tanto antiinflamatorios como antifibróticos de LT3000 en el modelo de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina. Por lo tanto, se realizaron estudios adicionales para evaluar la capacidad de LT3000 para prevenir o intervenir en la progresión de la fibrosis pulmonar después de lesión con bleomicina. Para este experimento, los ratones se asignaron de forma aleatoria a los siguientes grupos de tratamiento (Tabla 33). (i) Solución salina. Los ratones se sometieron a instilación intratraqueal (IT) de solución salina y recibieron inyección i.p de PBS estéril (vehículo). (ii) Grupo de BLEO. Los ratones se sometieron a instilación IT de bleomicina y recibieron inyección i.p de PBS estéril (vehículo). (iii) Grupo de prevención. Los ratones se sometieron a instilación IT de bleomicina y recibieron inyección i.p de LT3000 (50 mg/kg) q2d durante 6 días comenzando el mismo día que la instilación de bleomicina. (iv) Grupo de intervención. Los ratones se sometieron a instilación IT de bleomicina y recibieron inyección i.p de LT3000 (50 mg/kg) q2d comenzando el día 6 después de instilaciones de bleomicina. Todos los tratamientos con anticuerpos se administraron mediante inyección intraperitoneal (i.p.). A la terminación del estudio (día 14), los ratones se sacrificaron y los efectos de LT3000 en inflamación y fibrosis pulmonar inducida con bleomicina se evaluaron como sigue a continuación: (i) la fibrosis tisular se evaluó de forma semicuantitativa en secciones de pulmón teñidas con H&E usando los métodos de Ashcroft *et al.*, (J Clin Pathol. abril de 1988; 41 (4): 467-70); (ii) las células inflamatorias en el Fluido de Lavado Pulmonar se midieron usando citometría de flujo; (iii) los niveles de proteína en el fluido de lavado pulmonar se evaluaron usando el reactivo de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL.) y (iv) el peso corporal se midió en cada ratón el día 14 después de la instilación de bleomicina. Un resumen numérico de los efectos de LT3000 en inflamación y fibrosis pulmonar inducida por bleomicina se muestra en la Tabla 34.

Tabla 33. Programa de dosificación

Instilación intratraqueal	Tratamiento	Grupo (n)	Dosis (mg/kg)	Número de Dosis	Vía	Tratamiento
Solución salina	PBS	10	--	7	IP	Día de Inicio 0 dosificación q2d
Bleomicina	PBS	13	--	7	IP	Día de Inicio 0 dosificación q2d
Bleomicina	Intervención	13	LT3000 (50 mg/kg)	4	IP	Día de Inicio 0 Día final 6 dosificación q2d
Bleomicina	Prevención	13	LT3000 (50 mg/kg)	4	IP	Día de Inicio 6 Día final 12 dosificación q2d

Tabla 34: Resumen de Hallazgos Patofisiológicos

	Porcentaje de Reducción en Comparación con Bleomicina Sola	
	Estudio de prevención	Estudio de intervención
Fibrosis Tisular	20 % (p > 0,05)	22 % (p > 0,05)
Células inflamatorias en Fluido de Lavado Pulmonar	50 % (p < 0,01)	41 % (p < 0,05)
Niveles de Proteína en Fluido de Lavado Pulmonar	35 % (p > 0,05)	67 % (p > 0,05)
Peso corporal	Igual que el control salino	Igual que el control salino

- 5 Por lo tanto, se mostró que el anticuerpo anti-LPA (LT3000, Lpathomab) era eficaz tanto de forma profiláctica como de intervención en un modelo animal de fibrosis pulmonar bien aceptado. Estos hallazgos demuestran un papel profundo para el lípido bioactivo LPA en la producción de matriz extracelular y remodelación tisular después de lesión. Además, estos estudios identifican a LPA como una nueva diana clínica en el tratamiento de fibrosis asociada con una serie de enfermedades y sistemas orgánicos. Se cree que algunos anticuerpos monoclonales para LPA
- 10 tienen un gran potencial clínico para el tratamiento de fibrosis.

EJEMPLO 18: Modulación de citoquinas y factores de crecimiento con LT3000

- 15 Existe una necesidad sentida desde hace tiempo de formas menos invasivas para controlar la fibrosis (en especial, pero no limitada a, fibrosis pulmonar y hepática) que las biopsias que son el criterio de atención en la actualidad. Los investigadores han intentado correlacionar los niveles de citoquinas en circulación con los factores de crecimiento con extensión de fibrosis para permitir un control menos invasivo de la progresión de la enfermedad y/o de la eficacia del tratamiento a través del control de marcadores para enfermedad. Véase Morais *et al.*, (2006) Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol. 101 (Supl. I): 353-354. Se cree que un método para detectar fibrosis en una muestra del
- 20 paciente mediante correlación de los niveles de LPA con niveles de uno o más marcadores fibrogénicos (por ejemplo, citoquinas o factores de crecimiento) es útil para controlar la fibrosis en el entorno clínico.

- 25 Para investigar en más profundidad los efectos antiinflamatorios de LT3000, el nivel de citoquina y factores de crecimiento se evaluó en fluido de BAL usando las rutas específicas para matrices de proteína citoquina (Raybiotech Inc., Norcross GA.). La Tabla 35 resume los hallazgos preliminares (n = 3) con respecto a citoquinas inflamatorias que presentaban en mayor grado de regulación con LT3000.

Tabla 35: Resumen de Niveles de Expresión de Citoquina en Fluido de BAL
(ND = No significativo diferente en comparación con el grupo tratado con bleomicina)

Citoquina	Porcentaje de Reducción en Comparación con Bleomicina Sola	
	Estudio de prevención	Estudio de intervención
Interleuquina 6	79 % (p > 0,05)	ND

	Porcentaje de Reducción en Comparación con Bleomicina Sola	
Citoquina	Estudio de prevención	Estudio de intervención
MIP-3 beta	23 % (p > 0,05)	28 % (p > 0,05)
Eotaxina	63 % (p > 0,05)	53 % (p > 0,05)
Interleuquina 13	28 % (p > 0,05)	11 % (p > 0,05)
Factor de Estimulación de colonias de Granulocitos	45 % (p > 0,05)	24 % (p > 0,05)
Quimioquina Regulada por Timo y Activación (TARC)	18 % (p > 0,05)	ND
Inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1)	82 % (p < 0,01)	86 % (p < 0,01)
Factor-alfa de necrosis tumoral (TNFa)	82 % (p > 0,05)	86 % (p > 0,05)

A partir de la Tabla 35 se puede observar que los ratones con lesión pulmonar por bleomicina mostraban una disminución de niveles de IL-13 y TIMP-1, así como reducción de otros factores de crecimiento relevantes, después de tratamiento con el anticuerpo anti-LPA, Lpathomab (LT3000), y reducción consiguiente de la fibrosis pulmonar. Se cree que el patrón de niveles de citoquina y factor de crecimiento mostrados en la Tabla 35 es indicativo de una disminución de la fibrosis como respuesta al tratamiento. Por lo tanto, se cree que un panel de cambios de citoquina y factor de crecimiento, incluyendo los mostrados en la Tabla 35, es un ensayo y marcador clínico útil para tratamiento eficaz de la fibrosis, incluyendo fibrosis pulmonar, por ejemplo, con los agentes anti-LPA de la invención. Se podría tratar de un ensayo clínico mínimamente invasivo, y menos caro y arriesgado que la biopsia del tejido.

EJEMPLO 19: LPA en fibrosis renal

Dado que el LPA puede mediar una serie de procesos implicados en fibrosis y enfermedad renal, y sus receptores se estudiaron en un modelo animal de fibrosis renal. El modelo de obstrucción ureteral unilateral (UUO) imita el desarrollo de la fibrosis renal en forma acelerada, incluyendo inflamación, activación de fibroblastos y acumulación de matriz extracelular. J. P. Pradere *et al.*, (2007) *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 3110-3118, J.-P. Pradère, *et al.*, Lysophosphatidic acid and fibrosis renal, *Biochim. Biophys. Acta* (2008), doi: 10.1016 / j.bbaliip.2008.04.001.

Después de la UUO, se indujo la expresión del receptor LPA₁ y la producción de LPA renal aumentó 3,3 veces. Esto indicaba un papel para LPA y el receptor LPA₁ en la fibrosis renal causada por la UUO. Esto se confirmó con el hallazgo de que el desarrollo de fibrosis renal en ratones estaba atenuado en mutantes *-/-* de LPA₁. En un modelo diferente, más lento de fibrosis renal, el modelo de nefritis en suero nefrotóxica, que imita más estrechamente la lenta progresión de la enfermedad humana, la expresión de LPA₁ también aumentaba. Por lo tanto la evidencia apunta a un papel para LPA en la fibrosis renal y por lo tanto se cree que un agente anti-LPA tal como los anticuerpos monoclonales anti-LPA de la invención es un buen candidato para el tratamiento de la fibrosis renal.

Lpathomab (LT3000) se somete a ensayo en el modelo de UUO de ratón de acuerdo con Pradere *et al.*, 2007. La reducción de la inflamación y la matriz extracelular después del tratamiento con LT3000 en comparación con el control se examina de forma histológica y se cuantifica.

EJEMPLO 20: Humanización de Lpathomab (LT3000)

Materiales

El sustrato líquido de 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB) era de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La albúmina de suero bovino (BSA) sin ácido graso era de Calbiochem (La Jolla, CA). La Proteína A inmovilizada, papaína inmovilizada y columna de centrifugación de desalación de proteína eran de Pierce (Rockford, IL). El anticuerpo de IgG anti-humana (específico de Fc) se adquirió en Bethyl (Montgomery, TX). Las IgG de referencia (IgG humana no específica e IgG de ratón), el conjugado de IgG anti-humana (H+L)-peroxidasa de rábano picante y el conjugado de IgG anti-ratón (H+L) conjugada con peroxidasa de rábano picante eran de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). El ácido lisofosfatídico (LPA) y otros lípidos usados en el ELISA de competición se adquirieron en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). El LPA biotinilado se adquirió en Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT).

Humanización de LT3000

Los dominios variables del anticuerpo monoclonal anti-LPA murino, LT3000 (Lpathomab) se humanizaron mediante injerto de las CDR de murino en las regiones marco conservadas humanas (FR). Lefranc, P.F, (2003). *Nucleic Acids Res.* 31: 307-10; Martin, A. C. y J. M. Thornton, (1996) *J Mol Biol.* 1996. 263: 800-15; Morea, V., A. M. Lesk, y A.

Tramontano (2000) *Methods*, 20: 267-79; Foote, J. y G. Winter, (1992) *J Mol Biol*, 224: 487-99; Chothia, C, *et al.*, (1985). *J Mol Biol*, 186: 651-63.

5 Las secuencias de FR humana aceptora adecuadas se seleccionaron a partir de bases de datos de IMGT y Kabat basándose en una homología con LT3000 usando un alineamiento de secuencias y el programa de análisis (SR v7.6). Inicialmente se seleccionaron algunas secuencias con alta identidad en FR, restos de superficie de contacto de vernier, canónica y VH-VL (VCI). A partir de este subconjunto, las secuencias con las sustituciones de VCI más no conservativas, los restos de prolina o cisteína y mutaciones somáticas no habituales se excluyeron para la humanización. Un modelo tridimensional (3D) que contenía las secuencias de VL y VH humanizadas se construyó para identificar restos de FR yuxtapuestos a restos que forman las CDR. Estos restos de FR influyen potencialmente en la estructura en bucle de la CDR y la capacidad del anticuerpo para retener alta afinidad y especificidad para el antígeno. Basándose en este análisis, se identificaron 6 restos en AJ002773 y 3 restos en DQ187679, considerados significativamente diferentes de LT3000, y se consideraron para retromutación a la secuencia murina.

15 Expresión de anticuerpo y producción en células de mamífero

Los genes de anticuerpo murino se clonaron a partir de hibridomas. Los genes sintéticos que contenían las secuencias de armazón humano y las CDR murinas se ensamblaron a partir de oligonucleótidos sintéticos y se clonaron en pCR4Blunt-TOPO usando sitios de restricción romos. Después de secuenciación y observación de un 100 % de congruencia de secuencias, las cadenas pesada y ligera se clonaron y se expresaron como un anticuerpo quimérico de IgG1 de longitud completa usando el vector pConGamma para el gen de cadena pesada y el vector pConKappa para el gen de cadena ligera (Lonza Biologics, Portsmouth NH). El casete de expresión para cada uno de estos genes contenía un promotor, una secuencia kozak, y un terminador. Estos plásmidos se transformaron en *E. coli* (células de *E. coli* químicamente competentes para One Shot Top 10, Invitrogen, n.º de Cat C4040-10), cultivadas en medio LB y se almacenaron en glicerol. El ADN de plásmido a gran escala se preparó como lo describe el fabricante (Qiagen, kit MAXIPREP™ sin endotoxina, n.º de Cat 12362). Los plásmidos se transfectaron en la línea de células de riñón embrionario humano, 293F, usando 293fectina y usando Medios 293F-FreeStyle para cultivo. Los cultivos transfectados expresaban aproximadamente 2-12 mg/l de anticuerpo humanizado.

30 Purificación de anticuerpo

Los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo usando cromatografía de afinidad hacia proteína A. Se añadieron alícuotas que contenían 0,5 ml de resina ProSep-vA-Ultra (Millipore, n.º de Cat 115115827) a las columnas desechables de flujo por gravedad (Pierce, n.º de Cat 29924) y se equilibraron con 10-15 ml de tampón de unión (Pierce, n.º de Cat 21001). Los sobrenadantes de cultivo que contenían anticuerpo humanizado expresado de forma transitoria se diluyeron a 1:1 con tampón de unión y se pasaron sobre la resina. El anticuerpo retenido en la columna se lavó con 15 ml de tampón de unión, se eluyó con tampón de elución a pH bajo (Pierce, n.º de Cat 21004) y se recogió en fracciones de 1 ml que contenían 100 ul de tampón de unión para neutralizar el pH. Las fracciones con absorbancia (280 nm) > 0,1 se dializaron durante la noche (Casetes Slide-A-Lyzer de 3500 MWCO, Pierce, n.º de Cat 66382) frente a 1 litro de tampón PBS (Cellgro, n.º de Cat 021-030). Las muestras dializadas se concentraron usando concentradores centricon-YM50 (Amicon, n.º de Cat 4225) y se filtraron a través de membranas de acetato de celulosa de 0,22 uM (Costar, n.º de Cat 8160). La pureza de cada preparación se consiguió usando SDS-PAGE.

45 Electroforesis SDS-PAGE

Cada muestra de anticuerpo se diluyó a 0,5 ug/ul con tampón de carga de gel con 2-mercaptoetanol (reducido) o sin él (no reducido) (Sigma, n.º de Cat M-3148). Las muestras reducidas se calentaron a 95 °C durante 5 min mientras que las muestras no reducidas se incubaron a temperatura ambiente. Un gel en gradiente de un 4-12 % (Invitrogen, n.º de Cat NP0322) se cargó con 2 ug de anticuerpo por calle y se desarrolló a 170 voltios durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de desarrollo MOPS NuPAGE SDS a 1X (Invitrogen, n.º de Cat NP0001). Después de la electroforesis, los anticuerpos se fijaron por inmersión del gel en un 50 % de metanol, un 10 % de ácido acético durante ~10 min. El gel se lavó con 3 x 200 ml de agua destilada. Por último, las bandas se visualizaron por tinción del gel durante la noche en Colorante Azul GelCode® (Pierce, n.º de Cat 2490) y decolorando con agua.

55 ELISA cuantitativo

La titulación del anticuerpo se determinó usando un ELISA cuantitativo. El anticuerpo IgG-Fc anti humano de cabra (Bethyl A80-104A, 1 mg/ml) se diluyó a 1:100 en tampón de carbonato (NaHCO₃ 100 mM, Na₂CO₃ 33,6 mM, pH 9,5). Las placas se revistieron por incubación con 100 ul/pocillo de solución de revestimiento a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron 4 X con TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, Tween-20 al 0,05 %, pH 8,0) y se bloquearon con 200 ul/pocillo de TBS/BSA (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, BSA al 1 %, pH 8,0) durante 1 hora a 37 °C. Las muestras y el patrón se prepararon en placas de no unión con un volumen suficiente para el desarrollo por duplicado. El patrón se preparó por dilución de suero de referencia humana (Bethyl RS10-110; 4 mg/ml) en TBS-T/BSA (Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, BSA al 1 %, Tween-20 al 0,05 %, pH 8,0) a las siguientes concentraciones: 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,25 ng/ml, 15,625 ng/ml, 7,8125 ng/ml, y 0,0 ng/ml. Las muestras se prepararon realizando las

diluciones apropiadas en TBS-T/BSA, de modo que la densidad óptica (DO) de las muestras entraba dentro del intervalo del patrón; siendo el intervalo más lineal de 125 ng/ml 15,625 ng/ml. Después de lavar las placas 4 X con TBS-T, se añadieron 100 ul de la preparación de patrón/muestras a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 1 hora. A continuación, las placas se lavaron 4 X con TBS-T y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 100 ul/pocillo de anticuerpo de IgG anti-humana de cabra-HRP (Bethyl A80-104P, 1 mg/ml) diluido a 1:150.000 en TBS-T/BSA. Las placas se lavaron 4 X con TBS-T y se desarrollaron usando 100 ul/pocillo de sustrato TMB enfriado a 4 °C. Después de 7 minutos, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 1 M (100 ul/pocillo). La DO se midió a 450 nm, y los datos se analizaron usando el software Graphpad Prism. La curva patrón se ajustó usando una ecuación de cuatro parámetros y se usó para calcular el contenido de IgG humana en la muestra.

ELISA de unión directa

Las afinidades de unión a LPA de los anticuerpos humanizados se determinaron usando un ensayo de ELISA de unión directa. Las placas para microtitulación con ELISA (Costar) se revistieron durante la noche con 1,0 ug/ml de LPA C12:0 conjugado con albúmina de suero bovino (BSA) activada con maleimida Imject (Pierce Co.) diluido en tampón de carbonato 0,1 M (pH 9,5) a 37 °C for 1 h. Las placas se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4) y se bloquearon con PBS/BSA/Tween-20 durante 1 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. Para la incubación primaria (1 h a temperatura ambiente), una serie de dilución de los anticuerpos anti-LPA (0,4 ug/ml, 0,2 ug/ml, 0,1 ug/ml, 0,05 ug/ml, 0,0125 ug/ml, y 0 ug/ml) se añadió a la microplaca (100 ml por pocillo). Las placas se lavaron y se incubaron con 100 ul por pocillo de anti-humano de cabra conjugado con HRP (H+L) diluido a 1:20.000 (Jackson, n.º de cat 109-035-003) durante 1 h a temperatura ambiente. Después del lavado, la peroxidasa se desarrolló con sustrato de tetrametilbencidina (Sigma, n.º de Cat T0440) y se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. La CE₅₀ (concentración de unión semimáxima) se determinó con un ajuste de mínimos cuadrados de las curvas de dosis-respuesta con una ecuación de cuatro parámetros usando el software Graphpad Prism.

ELISA de competición para LPA

La especificidad del anticuerpo humanizado se determinó mediante ELISA de competición. El material de revestimiento de LPA C18:0 se diluyó a 0,33 ug/ml con tampón de carbonato (NaHCO₃ 100 mM, Na₂CO₃ 33,6 mM, pH 9,5). Las placas se revistieron con 100 ul/pocillo de solución de revestimiento y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron 4 veces con PBS (Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 20 mM, KCl 27 mM, NaCl 1,37 mM, pH 7,4) y se bloquearon con 150 ul/pocillo de PBS, BSA al 1 %, Tween-20 al 0,1 % durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos anti-LPA humanizados se sometieron a ensayo frente a competidores lipídicos (LPA 14:0 (Avanti, n.º de Cat 857120), LPA 18:1 (Avanti, n.º de Cat 857130), LPA 18:1 (Avanti, n.º de Cat 845875), cLPA (Avanti, n.º de Cat 857328), PA 18:1 (Avanti, n.º de Cat 840875), PC (Avanti, n.º de Cat 850454) a 5 uM, 2,5 uM, 1,25 uM, 0,625 uM, y 0,0 uM. El anticuerpo se diluyó a 0,5 ug/ml en PBS, Tween-20 al 0,1 % y se combinó con las muestras lipídicas a una proporción a 1:3 de anticuerpo con respecto a muestra en una placa de no unión. Las placas se lavaron 4 veces con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 ul/pocillo del complejo de anticuerpo primario/lípido. A continuación, las placas se lavaron 4 veces con PBS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con 100 ul/pocillo de anticuerpo anti-humano de cabra conjugado con HRP diluido a 1:20.000 en PBS, BSA al 1 %, Tween-20 al 0,1 %. De nuevo, las placas se lavaron 4 veces con PBS y se desarrollaron usando sustrato de TMB (100 ul/pocillo) a 4 °C. Después de 8 minutos, la reacción se detuvo con 100 ul/pocillo de H₂SO₄ 1 M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. Los datos sin procesar se transfirieron al software GraphPad para análisis.

Termoestabilidad

La termoestabilidad de los anticuerpos humanizados se estudió midiendo su afinidad de unión hacia LPA (CE₅₀) después de calentamiento usando el ELISA de unión directa. Los anticuerpos se disolvieron en PBS (Cellgo, n.º de Cat 021-040) a 25 ug/ml y se incubaron a 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C y 80 °C durante 10 min. Antes de elevar la temperatura, se retiraron 10 ul de cada muestra y se diluyeron con 90 ul de PBS y se almacenaron en hielo. Las muestras a continuación se sometieron a agitación vorticial brevemente y el material insoluble se retiró por centrifugación durante 1 min a 13.000 rpm. La actividad de unión del sobrenadante se determinó usando el ELISA de unión a LPA y se comparó con un control, que consistía en la misma muestra sin tratamiento térmico.

Resonancia de Plasmones Superficiales

Todos los datos de unión se recogieron en un biosensor óptico ProteOn (BioRad, Hercules CA). El LPA 12:0-tiol y el LPA 18:0-tiol se acoplaron a un chip sensor de GLC modificado con maleimida (n.º de Cat 176-5011). En primer lugar con el chip de GLC se activó con una mezcla igual de sulfo-NHS/EDC durante siete minutos seguido de una etapa de bloqueo de 7 minutos con etildiamina. A continuación, el sulfo-MBS (Pierce Co., n.º de Cat 22312) se pasó sobre las superficies a una concentración de 0,5 mM en tampón de desarrollo HBS (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,005 %, pH 7,4). El LPA-tiol se diluyó en el tampón de desarrollo HBS a una concentración de 10, 1 y 0,1 uM y se inyectó durante 7 minutos produciendo 3 superficies de LPA de diferentes densidades (~100, ~300 y

~1400 RU). A continuación, los datos de unión para los anticuerpos humanizado se recogieron usando una serie de dilución de 3 veces comenzando con 25 nM como la concentración más elevada (cada una de las soluciones de reserva originales se diluyeron de 1 a 100). Las superficies se regeneraron con un pulso de 10 segundos de HCl 100 mM. Todos los datos se recogieron a 25 °C. Los controles se procesaron usando una superficie de referencia como inyecciones de blanco. Los datos de respuesta de cada superficie presentaban un comportamiento de unión complejo que probablemente estaba causado por diversos grados de unión multivalente. Para extraer cálculos de las constantes de unión, los datos de las concentraciones de anticuerpos variables se ajustaron de forma global usando modelos de 1 sitio y 2 sitios. Esto produjo cálculos de la afinidad para el sitio bivalente (sitio 1) y el sitio monovalente (sitio 2).

Capacidad de unión molar a LPA

La proporción molar de LPA:mAb se determinó usando un ensayo de desplazamiento. Los tubos de borosilicato (Fisherbrand, n.º de Cat 14-961-26) se revistieron con 5 nanomoles de LPA biotinilado (50 ug de lípido (Echelon Biosciences, n.º de Cat L-012B, Lote n.º F-66-136 se suspendieron en 705 ul de cloroformo:metanol a 1:1 proporcionando una solución 100 uM) usando una corriente de nitrógeno seco. Los tubos revestidos se incubaron con 75 ul (125 pmoles) de anticuerpo disuelto en PBS (Cellgro, n.º de Cat 021-030) a temperatura ambiente. Después de 3 horas de incubación, los complejos de LPA:mAb se separaron del lípido libre usando columnas de desalación de proteína (Pierce, n.º de Cat. 89849), y la concentración molar del LPA biotinilado unido se determinó usando el ensayo de desplazamiento de HABA/Avidina (Pierce, n.º de Cat 28010) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Medición de la liberación de IL-8 Inducida por LPA en células SKOV3

Los anticuerpos anti-LPA inhiben la liberación CXCL8/IL-8 humanas dependiente de LPA en medios acondicionados de células de ovario SKOV3. Las células SKOV3 cells (Lote n.º 4255558, pasaje 14) se cosecharon con 2 ml de 1 X Tripsina EDTA (Mediatech Inc, n.º de Cat 25-053-CV) y se volvieron a suspender en 8 ml de medio completo (FBS al 10 %, Mediatech Inc. n.º de Cat. 35-011-CV). Las células se centrifugaron durante 5 min (11.000 rpm) y se volvieron a suspender en 5 ml de medio completo. Se hizo recuento de las células por duplicado con azul de Tripiano al 0,4 % (10 ul células más 90 ul de azul de Tripiano, Invitrogen, n.º de Cat 15250-061) usando un hemocitómetro. En una placa de 96 pocillos, se sembraron 1 x 10⁵ células por pocillo (volumen final 100 ul/pocillo). Se permitió que las células se unieran informaran una monocapa confluyente mediante incubación durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, las células se lavaron minuciosamente dos veces con medio mínimo (1 mg/ml de BSA en medio de McCoy con L-glutamina, Mediatech, n.º de Cat 10-050-CV). El medio se ajustó a un 1 % de penicilina/estreptomina (Mediatech, n.º de Cat 30-002 CI) y 2,2 g/l de bicarbonato sódico (Mediatech, n.º de Cat 25-035-CI). A continuación, las células se privaron de suero a 37 °C durante exactamente 24 h, seguido de estimulación de citoquina con 100 uM de LPA C18:1 (Avanti, n.º de Cat 857130) disuelto en 1 mg/ml de BSA/PBS (Calbiochem, n.º de Cat 126575) en presencia o ausencia de anticuerpo LPA. Después de 22 h de estimulación, las células se centrifugaron durante 5 min (13.500 rpm) a 4 °C y los sobrenadante se recogieron. Los niveles de CXCL8/IL-8 en cada sobrenadante se midieron usando el kit Quantikine de CXCL8/IL-8 humano de acuerdo con las instrucciones del vendedor (R&D Systems, n.º de Cat D8000C).

Medición de la migración de células tumorales en el ensayo de raspado

Las células SKOV3 se sembraron a 15.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente, las células se privaron de suero en medio mínimo (Medio de McCoy 5a, ajustado para contener L-Glutamina, 2,2 g/l de Bicarbonato Sódico, un 1 % de penicilina/estreptomina y 1 mg/ml de BSA) durante 24 horas. En el tiempo 0, las células se rasparon con una punta de pipeta p200 hacia el centro de cada pocillo, se lavaron con medio mínimo y se tomaron fotografías antes del tratamiento. Las células se trataron a continuación con LPA (C18:1) a concentraciones de 0,2 uM, 1,0 uM y 10 uM y se incubaron previamente a 37 °C con LPA 1,0 uM en presencia o ausencia de anticuerpo a 150 ug/ml. También se sometieron a ensayo el control positivo (células tratadas con FBS al 10 %) y anticuerpo solo. Las células se estimularon durante 17 horas a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5 %. De se tomaron fotografías de nuevo 17 horas después del tratamiento y el % de cierre de la herida se midió ajustando las fotografías al mismo tamaño y midiendo el ancho del raspado en el tiempo 0 y el tiempo 17 horas con una regla.

Ensayos de Matrigel

Los ratones C57BL/6 hembra de aproximadamente 8 a 10 semanas de edad y Matriz de Matrigel de Concentración Elevada se adquirieron en BD BioSciences (Franklin Lakes, NJ (de BD) mezclado con 50 ng/ml de VEGF y 50 ng/ml de bFGF, 3 ng/ml de heparina como estímulos angiogénicos se usaron para este estudio. Había cinco grupos de ratones, se inocularon 10 tapones de Matrigel en cinco ratones por cada grupo el Día 0. Un ratón del grupo sirvió como un control; los otros cuatro recibieron tratamiento farmacológico en cuatro dosis diferentes mediante inyección ip cada dos días. Todos los tratamientos comienzan el Día -1 y acaban el Día 8.

A treinta ratones C57bL/6 se les implantaron tapones de Matrigel para obtener 25 ratones sanos con dos tapones de Matrigel bien modelados por ratón. El Día 0, se inyectaron 500 ul de Matrigel a 40 °C por vía subcutánea a cada

5 costado del ratón, la zona de la inyección se rasuró. Para aumentar la zona de contacto del Matrigel inyectado en tejidos cutáneos y para formar un tapón con forma redonda, se formó un amplio bolsillo subcutáneo moviendo la punta de la aguja hacia la derecha y hacia la izquierda después de una inserción subcutánea de rutina. La inyección se realizó rápidamente con una aguja de tamaño apropiado (21G-25G) para asegurar que todo el contenido se administraba en un tapón. El Matrigel inyectado formó rápidamente un solo tapón de gel sólido.

Los animales se trataron con 8 o 2 mg/kg de anticuerpo o solución salina comenzando el día 1 antes del implante de los tapones de Matrigel o con el vehículo. Los tratamientos se administraron ip, en una programación de q2d.

10 Los tapones de cada grupo se recogen el Día 12. Los ratones se sacrificaron y la piel del ratón se retiró para exponer el tapón. Los tapones se diseccionaron y se fijaron para análisis histológico. Las secciones de 5 µm de tapones embebidos en parafina se tiñeron con anticuerpos anti-CD-31. Se analizó la densidad del vaso sanguíneo en un área de sección transversal de cada uno de los tapones de Matrigel. Para cada grupo de tratamiento, al menos seis o más tapones de Matrigel se analizaron de forma cuantitativa para evaluar cualquier diferencia estadísticamente significativa de la densidad de los microvasos entre grupos.

Resultados

20 La secuencia del mAb anti-LPA murino, LT3000, se humanizó con el objetivo de producir un anticuerpo que detuviera una afinidad, especificidad y capacidad de unión a LPA elevadas.

Modificación por ingeniería de las variantes humanizadas

25 El anticuerpo anti-LPA murino se humanizó por injerto de las CDR de Kabat de V_H y V_L de LT3000 en armazones humanos aceptores. Siete variantes humanizadas se expresaron de forma transitoria en células HEK 293 en condiciones sin suero, se purificaron y a continuación se caracterizaron en un panel de ensayos. Los plásmidos que contenían secuencias de cada cadena ligera y cada cadena pesada se transfectaron en células de mamífero para la producción. Después de 5 días de cultivo, la titulación de mAb se determinó mediante ELISA cuantitativo. Todas las combinaciones de las cadenas pesadas y ligeras proporcionaron entre 2-12 µg de anticuerpo por ml de cultivo celular.

Caracterización de las variantes humanizadas

35 Todas las variantes de mAb anti-LPA humanizado presentaban afinidad de unión en el intervalo picomolar bajo similar a la del anticuerpo quimérico anti-LPA (también conocido como LT3010) y el anticuerpo murino LT3000. Todas las variantes humanizadas presentaban una T_M similar o superior a la de LT3000. Con respecto a la especificidad, las variantes humanizadas demostraban perfiles de especificidad similares a los de LT3000. Por ejemplo, LT3000 no demostraba reactividad cruzada con lisofosfatidil colina (LPC), ácido fosfatídico (PA), diversas isoformas de ácido lisofosfatídico (LPA 14: 0 y 18: 1, ácido fosfatídico cíclico (cPA), y fosfatidilcolina (PC).

Actividad de las variantes humanizadas

45 Cinco variantes humanizadas se evaluaron adicionalmente en ensayos de células *in vitro*. Se sabe que LPA desempeña un papel importante en la obtención de la liberación de interleuquina-8 (IL-8) de células cancerosas. LT3000 reduce la liberación de IL-8 de células de cáncer de ovario en una forma dependiente de la concentración. Las variantes humanizadas presentaban una reducción similar de liberación de IL-8 en comparación con LT3000.

50 Algunas variantes humanizadas también se sometieron a ensayo para su efecto en la densidad de los microvasos (MVD) en un ensayo de formación de tubos de Matrigel para neovascularización. Se demostró que ambos disminuían la formación de MVD.

Tabla 36: Cuantificación de la densidad de los microvasos sanguíneos usando inmunotinción de CD31 con tinción de contraste de H&E en tapones de Matrigel.

		LT3000 murino (8 mg/kg)	LT3000 murino (2 mg/kg)	Variante n.º 1 Humanizada (8 mg/kg)	Variante n.º 1 Humanizada (2 mg/kg)	Variante n.º 2 Humanizada (2 mg/kg)
Promedio	64,2	41,5	34	34,4	49	50,8
S.E.	8,0	14,2	13,7	4,2	31,5	18,8
N =	5	4	5	5	5	6
Porcentaje Inhibición		35,4	47,0	46,4	23,7	20,8

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Lpath, Inc.
 Hansen, Genevieve
 Sabbadini, Roger A.
 Swaney, James
 Garland, William

10 <120> Composiciones y métodos para la unión al ácido lisofosfatídico

<130> LPT-3200-PC

15 <150> US 60/940,964
 <151> 30-05-2007

<160> 131

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido

30 <400> 1
 atgaaatgca gctggggcat sttcttc 27

<210> 2
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido

40 <400> 2
 atgggatgga gctratcat sytctt 26

<210> 3
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido

50 <400> 3
 atgaagwtgt ggttaaactg ggttttt 27

55 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

	<400> 4 atgractttg ggytcagctt grttt	25
5	<210> 5 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 5 atggactcca ggctcaattt agttttcctt	30
15	<210> 6 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 6 atggctgtcy trgsgctrct cttctgc	27
25	<210> 7 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 7 atggratgga gckggrtctt tmtctt	26
40	<210> 8 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
45	<400> 8 atgagagtgc tgattctttt gtg	23
50	<210> 9 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
55	<400> 9 atggmttggg tgtggamctt gctattcctg	30

	<210> 10	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 10	
10	atgggcagac ttacattctc attcctg	27
	<210> 11	
	<211> 28	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 11	
20	atggattttg ggctgatttt ttttattg	28
	<210> 12	
	<211> 27	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
30	<400> 12	
	atgatggtgt taagtcttct gtacctg	27
	<210> 13	
35	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Oligonucleótido	
	<400> 13	
	atatccacca tggratgsag ctgkgtmats ctctt	35
45	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 14	
	cagtggatag acagatgggg g	21
55	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido	
	<400> 15	
	.cagtggatag accgatgggg c	21
10	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 16	
	cagtggatag actgatgggg g	21
20	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 17	
	caagggatag acagatgggg c	21
30	<210> 18	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 18	
40	ggcagcacta gtaggggcca gtggata	27
	<210> 19	
	<211> 32	
	<212> ADN	
45	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
50	<400> 19	
	gggcacatg gagácagaca cactcctgct at	32
	<210> 20	
	<211> 33	
55	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	

	<223> Oligonucleótido	
	<400> 20	
5	gggcacccatg gattttcaag tgcagatttt cag	33
	<210> 21	
	<211> 34	
	<212> ADN	
10	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 21	
15	gggcacccatg gagwcacakw ctcaggtctt trta	34
	<210> 22	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
25	<400> 22	
	gggcacccatg kccccwrctc agytyctkgt	30
	<210> 23	
30	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
35	<400> 23	
	caccatgaag ttgcctgtta ggctgttg	28
	<210> 24	
40	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucleótido	
	<400> 24	
	atgaagttgv vtgtaggct gttggtgctg	30
50	<210> 25	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 25	

	atggagwcag acacactcct gytatgggtg	30
5	<210> 26 <211> 30 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 26 atgagtgtgc tcactcaggt cctggsgttg	30
15	<210> 27 <211> 33 <212> ADN . <213> artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 27 atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg	33
25	<210> 28 <211> 29 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
35	<400> 28 atggatttwa ggtgcagatt wtcagcttc	29
40	<210> 29 <211> 27 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
45	<400> 29 atgaggtkck ktgktsagst sctgrgg	27
50	<210> 30 <211> 31 <212> ADN <213> artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
55	<400> 30 atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g	31
	<210> 31	

	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 31	
	atgtggggay ctktttycmm tttttcaatt g	31
10	<210> 32	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 32	
20	atggtrtccw casctcagtt ccttg	25
	<210> 33	
	<211> 27	
	<212> ADN	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
30	<400> 33	
	atgtatatat gtttggtgtc tattttct	27
	<210> 34	
	<211> 28	
35	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
40	<400> 34	
	atggaagccc cagctcagct tctcttcc	28
	<210> 35	
45	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
50	<223> Oligonucleótido	
	<400> 35	
	tgggtatctg gtrcstgtg	19
55	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> artificial	

	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
5	<400> 36 atggagwcag acacactsct g		21
	<210> 37		
	<211> 26		
10	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
15	<400> 37 atgragtywc agaccaggt cttirt		26
	<210> 38		
	<211> 26		
20	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
25	<400> 38 atggagacac attctcaggt ctttgt		26
	<210> 39		
30	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido		
	<400> 39 atggattcac aggcccaggt tcttat		26
40	<210> 40		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 40 atgatgagtc ctgcccagtt cctctt		26
50	<210> 41		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
55	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 41		

	atgaatttgc ctgttcatct cttggtgct	29
5	<210> 42 <211> 29 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido <400> 42 atggattttc aattggtcct catctcctt	29
15	<210> 43 <211> 26 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido <400> 43 atgaggtgcc tarcttsagtt cctgrg	26
25	<210> 44 <211> 26 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido <400> 44 atgaagtact ctgctcagtt tctagg	26
35	<210> 45 <211> 26 <212> ADN' <213> artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido <400> 45 atgaggcatt ctcttcaatt cttggg	26
45	<210> 46 <211> 20 <212> ADN <213> artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido <400> 46 actggatggt gggaagatgg	20
55	<210> 47	

ES 2 585 702 T3

	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 47	
	gaagatctag acttactatg cagcatcagc	30
10	<210> 48	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> líder	
	<400> 48	
20	atgtctgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cgcccgtgt	60
	<210> 49	
	<211> 57	
	<212> ADN	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> líder	
	<400> 49	
30	atggaatgga gctgggtggt cctgttcttt ctgtccgtga ccacagcgt gcattct	57
	<210> 50	
	<211> 30	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 50	
	ggagacgcct tcacaaatta cttaatagag	30
40	<210> 51	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
45	<400> 51	
	ctgattatc ctgatagtgg ttacattaac tacaatgaga acttcaaggg c	51
	<210> 52	
50	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 52	
55	agatttgctt actacggtag tggctactac tttgactac	39
	<210> 53	

ES 2 585 702 T3

<211> 48
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 53
 agatctagtc agagccttct aaaaactaat ggaaacacct atttacct 48

<210> 54
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 54
 aaagtttcca accgattttc tggg 24

15

<210> 55
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 55
 tctcaaagta cacattttcc attcacg 27

25

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30

<400> 56
 Gly Asp Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu
 1 5 10

35

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 57
 Leu Ile Tyr Pro Asp Ser Gly Tyr Ile Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
 1 5 10 15

40

Gly

<210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

45

<400> 58
 Arg Phe Ala Tyr Tyr Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

50

<210> 59

ES 2 585 702 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5 <400> 59
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 60
 15 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
 1 5
 <210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 61
 Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr
 1 5
 25
 <210> 62
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 62
 Asn Tyr Leu Ile Glu
 1 5
 35
 <210> 63
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 40 <400> 63
 ggatacggct tcattaatta cttaatagag 30
 <210> 64
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 64
 50 ctgattaatc ctggaagtga ttatactaac tacaatgaga acttcaaggg c 51
 <210> 65
 <211> 39

ES 2 585 702 T3

<212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 <400> 65
 5 agatttggtt actacggtag cggcaactac tttgactac 39

 <210> 66
 <211> 48
 <212> ADN
 10 <213> *Mus musculus*

 <400> 66
 acatctggtc agagccttgt ccacattaat ggaaacacct atttaccat 48

 <210> 67
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 <400> 67
 20 aaagtttcca acctatatttc t 21

 <210> 68
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 <400> 68
 30 tctcaaagta cacatatttcc attcacg 27

 <210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35
 <400> 69

 Gly Tyr Gly Phe Ile Asn Tyr Leu Ile Glu
 1 5 10

 <210> 70
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 70
 45

 Leu Ile Asn Pro Gly Ser Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 71
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50

ES 2 585 702 T3

<400> 71

Arg Phe Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

5

<210> 72
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 72

Thr Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

15

<210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 73

Lys Val Ser Asn Leu Phe Ser
 1 5

25

<210> 74
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

30

<400> 74

Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr
 1 5

35

<210> 75
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 75

ggagacgcct tcactaatta cttgatcgag 30

40

<210> 76
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

45

<400> 76

ctgattattc ctggaactgg ttatactaac tacaatgaga acttcaaggg c 51

50

<210> 77
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

ES 2 585 702 T3

<400> 77
agatttggtt actacggtag tagcaactac tttgactac 39

5 <210> 78
<211> 48
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

10 <400> 78
agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct atttacat 48

15 <210> 79
<211> 21
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

20 <400> 79
aaagtttcca accgattttc t 21

25 <210> 80
<211> 27
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

30 <400> 80
tctcaaagta cacattttcc attcact 27

35 <210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

Gly Asp Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5 10

40 <210> 82
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 82
Leu Ile Ile Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

45 Gly

50 <210> 83
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 83

ES 2 585 702 T3

Arg Phe Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 84
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 84

10 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

15 <210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 85

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

20 1 5

<210> 86
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 86

Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr
 1 5

30 <210> 87
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 87
 ggagacgcct tcactaatta cttgatcgag

30

40 <210> 88
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

45 <400> 88
 ctgattattc ctggaactgg ttatactaac tacaatgaga acttcaaggg c .

51

50 <210> 89
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 89
 agatttggtt actacggtag tggctactac tttgactac

39

ES 2 585 702 T3

<210> 90
 <211> 48
 <212> ADN
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 90
 agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct atttaccat 48

 10 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 15 <400> 91
 aaagtttcca accgattttc t 21

 <210> 92
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

 <400> 92
 tctcaaagta cacattttcc attcacg 27

 25 <210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 30 <400> 93

 Gly Asp Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu
 1 5 10

 35 <210> 94
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 40 <400> 94

 Leu Ile Ile Pro Gly Thr Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 95
 45 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 95
 50

ES 2 585 702 T3

Arg Phe Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 96
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 96

10 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

15 <210> 97
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 97

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

20 <210> 98
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 98

Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr
 1 5

30 <210> 99
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 99
 ggcttctcca tcaccagtgg ttattactgg acc 33

40 <210> 100
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

45 <400> 100
 tacataggct acgatggtag caatgactcc aacctatctc tcaaaaat 48

50 <210> 101
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 101

ES 2 585 702 T3

gcgatgttgc ggcgaggatt tgactac 27

5 <210> 102
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 102
 agtgccagct caagttaag ttacatgcac 30

15 <210> 103
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 103
 gacacatcca aactggcttc t 21

25 <210> 104
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 104
 catcggcgga gtagttacac g 21

35 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <400> 105

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

45 <210> 106
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

50 <400> 106

Tyr Ile Gly Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

55 <210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

60 <400> 107

Ala Met Leu Arg Arg Gly Phe Asp Tyr
 1 5

ES 2 585 702 T3

aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttctgt tctttctgtc cgtgaccaca 60
 ggcgtgcatt ctcaggtcaa gctgcagcag tctggacctg agctggtaag gcctgggact 120
 tcagtgaagg tgtcctgcac ggcttctgga gacgccttca caaattactt aatagagtgg 180
 gtaaaacaga ggcctggaca gggccttgag tggattggac tgatttatcc tgatagtgg 240
 tacattaact acaatgagaa cttcaagggc aaggcaacac tgactgcaga cagatcctcc 300
 agcactgcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcggg ctatttctgt 360
 gcaagaagat ttgcttacta cggtagtggc tactactttg actactgggg ccaaggcacc 420
 actctcacag tctctcagc ctccaccaag ggccc 455

5 <210> 113
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 113

10 aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60
 acagacgccc gctgtgatgt tgtgatgacc caaactccac tctcctgcc tgtcagtctt 120
 ggagatcaag cctccatctc ttgcagatct agtcagagcc ttctaaaac taatggaaac 180
 acctatttac attggtacct gcagaagcca ggccagtctc caaaactcct aatcttcaaa 240
 gttccaacc gattttctgg ggtcccggac aggttcagtg gcagtggatc agggacagac 300
 ttcacactca agatcagcag agtggaggct gaggatctgg gagtttattt ctgctctcaa 360
 agtacacatt ttccattcac gttcggcagc gggacaaaat tggaaataaa acgtacg 417

15 <210> 114
 <211> 151
 <212> PRT
 <2'13> *Mus musculus*

<400> 114

ES 2 585 702 T3

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

Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly
 20 25 30

Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Thr Ala
 35 40 45

Ser Gly Asp Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg
 50 55 60

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Tyr Pro Asp Ser Gly
 65 70 75 80

Tyr Ile Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
 85 90 95

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

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Phe Ala Tyr Tyr Gly
 115 120 125

Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 130 135 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 145 150

<210> 115

<211> 139

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 115

ES 2 585 702 T3

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

<210> 116
 <211> 455
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 116

aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttctctgt tctttctgtc cgtgaccaca 60
 ggcgtgcatt ctcagggtcca actgcagcag tctggagctg agctggtaag gcctgggact 120
 tcagtgaagg tgtcctgcaa ggcttctgga tacggcttca ttaattactt aatagagtgg 180
 ataaaacaga ggcttgaca ggccttgag tggattggac tgattaatcc tggaagtgat 240
 tatactaact acaatgagaa cttcaagggc aaggcaacac tgactgcaga caagtctctcc 300
 agcactgcct acatgcacct cagcagcctg acatctgagg actctgcggt ctatttctgt 360
 gcaagaagat ttggttacta cggtagcggc aactactttg actactgggg ccaaggcacc 420
 actctcacag totcctcagc ctccaccaag ggccc 455

<210> 117
 <211> 417

<212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 117

5
 aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60
 acagacgccc gctgtgatgt tgtgatgacc caaactccac tctccctgcc tgtcagtctt 120
 ggagatcaag cctccatctc ttgcacatct ggtcagagcc ttgtccacat taatggaaac 180
 acctatttac attggtacct gcagaagcca ggccagtctc caaagctcct catctacaaa 240
 gtttccaacc tattttctgg ggtcccagac aggttcagtg gcagtggatc agggacagat 300
 ttcacactca agatcagcag agtggaggct gaggatctgg gagtttattt ctgctctcaa 360
 agtacacatt ttccattcac gttcggcagc gggacaaaat tggaaataaa acgtacg 417

<210> 118
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 118

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

15

ES 2 585 702 T3

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
145 150

<210> 119
<211> 139
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 119

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

Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr
20 25 30

Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys
35 40 45

Thr Ser Gly Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
50 55 60

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Val Ser Asn Leu Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
85 90 95

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
100 105 110

Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr Phe
115 120 125

Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
130 135

10

<210> 120
<211> 455
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

15

<400> 120

aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttctctgt tctttctgtc cgtgaccaca 60

ggcgtgcatt ctcaggtcca gctgcagcag tctggagctg agctggtcag gcctgggact 120

tcagtgaagg tgtctctgcaa ggcttctgga gacgccttca ctaattactt gatcgagtgg 180

ES 2 585 702 T3

gtaaagcaga ggcctggaca gggccttgag tggattggac tgattattcc tggaactggt 240
 tatactaact acaatgagaa cttcaagggc aaggcaacac tgactgcaga caaatcctcc 300
 agcactgcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcggt ctatttctgt 360
 gcaagaagat ttggttacta cggtagtagc aactactttg actactgggg ccaaggcacc 420
 actctcacag tctcctcagc ctccaccaag ggccc 455

<210> 121
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5
 <400> 121
 aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60
 acagacgccc gctgtgatgt tgtgatgacc caaactccac tctcctgcc tgtcagctctt 120
 ggagatcaag cctccatctc ttgcagatct agtcagagcc ttgtacacag taatggaaac 180
 acctatattac attgggtacct gcagaagcca ggccagtctc caaagctcct gatctacaaa 240
 gtttccaacc gattttctgg ggtcccagac aggttcagtg gcagtggacc agggacagat 300
 ttcacactca agatcagcag agtggaggct gaggatctgg gaatttattt ctgctctcaa 360
 10 agtacacatt ttccattcac tttcggcacg gggacaaaat tggaaataaa acgtacg 417

<210> 122
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15
 <400> 122
 Lys Leu Ala Ala Thr Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
 20 25 30
 Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 35 40 45
 Ser Gly Asp Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg
 50 55 60
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Ile Pro Gly Thr Gly
 65 70 75 80
 Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
 85 90 95

ES 2 585 702 T3

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

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Phe Gly Tyr Tyr Gly
 115 120 125

Ser Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 130 135 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 145 150

<210> 123

<211> 139

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 123

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

Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr
 20 25 30

Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys
 35 40 45

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 50 55 60

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys
 65 70 75 80

Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 85 90 95

Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
 100 105 110

Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr Phe
 115 120 125

Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 130 135

10

<210> 124

<211> 455

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 124

```

aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttcctgt tctttctgtc cgtgaccaca      60
ggcgtgcatt ctcaggtcca gctgcagcag tctggagctg agctggtcag gcctgggact      120
tcagtgaagt tgtcctgcaa ggcttctgga gacgccttca ctaattactt gatcgagtgg      180
gtaaagcaga ggccctggaca gggccttgag tggattggac tgattattcc tggaactggt      240
tatactaact acaatgagaa cttcaagggc aaggcaacac tgactgcaga caagtcctcc      300
agcactgcct acatgcagct cagcagcctg acatctgagg actctgcggt ctatttctgt      360
gcaagaagat ttggttacta cggtagtggc tactactttg actactgggg ccaaggcacc      420
actctcacag totcctcagc ctccaccaag ggccc                                     455

```

5

<210> 125

<211> 417

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 125

```

aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg      60
acagacgccc gctgtgatgt tgtgatgacc caaactccac tctccctgcc tgtcagtctt      120
ggagatcaag cctccatctc ttgcagatct agtcagagcc ttgtacacag taatggaaac      180
acctatttac attggtacct gcagaagcca ggccagtctc caaagctcct gatctacaaa      240
gtttccaacc gattttctgg ggtcccagac aggttcagtg gcagtggacc agggacagat      300
ttcacactca agatcagcag agtggaggct gaggatctgg gagtttattt ctgctctcaa      360
agtacacatt ttccattcac gttcggcacg ggcacaaaat tggaaataaa acgtacg       417

```

15

<210> 126

<211> 151

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 126

```

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

Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
                20           25           30

Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala
                35           40           45

```

20

ES 2 585 702 T3

Ser Gly Asp Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Ile Pro Gly Thr Gly
65 70 75 80

Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
85 90 95

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

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Phe Gly Tyr Tyr Gly
115 120 125

Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
130 135 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
145 150

<210> 127

<211> 139

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 127

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

Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr
20 25 30

Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys
35 40 45

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
50 55 60

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
85 90 95

10

ES 2 585 702 T3

Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
 100 105 110

Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr Phe
 115 120 125

Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 130 135

<210> 128
 <211> 443
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 128

aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttcctgt tctttctgtc cgtgaccaca 60
 ggcgtgcatt ctgatataca gcttcaggag tcaggacctg gcctcgtgaa accttctcag 120
 tctctgtctc tcacctgctc tgtcactggc ttctccatca ccagtggta ttactggacc 180
 tggatccggc agtttcagg aaacaaactg gagtgggtgg cctacatagg ctacgatggt 240
 agcaatgact ccaaccctc tctcaaaaat cgaatctcca tcaccctgga cacatctaag 300
 aaccagtttt tctgaagtt gaattctgtg actactgagg acacagccac atattactgt 360
 gcaagagcga tgttgccggc aggatttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 420
 tctcagcct ccaccaaggg ccc 443

10

<210> 129
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 129

aagcttgccg ccaccatgct tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggetg 60
 acagacgccc gctgtcaaat tgttctcacc cagtctccag caatcatgct tgcactcca 120
 ggggagaagg tcaccatgac ctgcagtgcc agctcaagtt taagttacat gcactggtac 180
 cagcagaagc caggcacctc ccccaaaaga tggatttatg acacatccaa actggcttct 240
 ggagtcctctg ctgccttcag tggcagtggg tctgggacct cttattctct cacaatcagc 300
 agcatggagg ctgaagatgc tgccacttat tactgccatc ggcggagtag ttacacgttc 360
 ggagggggga ccaagctgga aataaaactg acg 393

20

<210> 130
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 585 702 T3

<400> 130

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

Ser Val Thr Thr Gly Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Glu Ser Gly
20 25 30

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val
35 40 45

Thr Gly Phe Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln
50 55 60

Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Gly Tyr Asp Gly
65 70 75 80

Ser Asn Asp Ser Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg
85 90 95

Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr
100 105 110

Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Leu Arg Arg Gly
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly
145

5

<210> 131

<211> 131

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

10

<400> 131

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

Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser
20 25 30

Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
35 40 45

ES 2 585 702 T3

Ser Ala Ser Ser Ser Leu Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
85 90 95

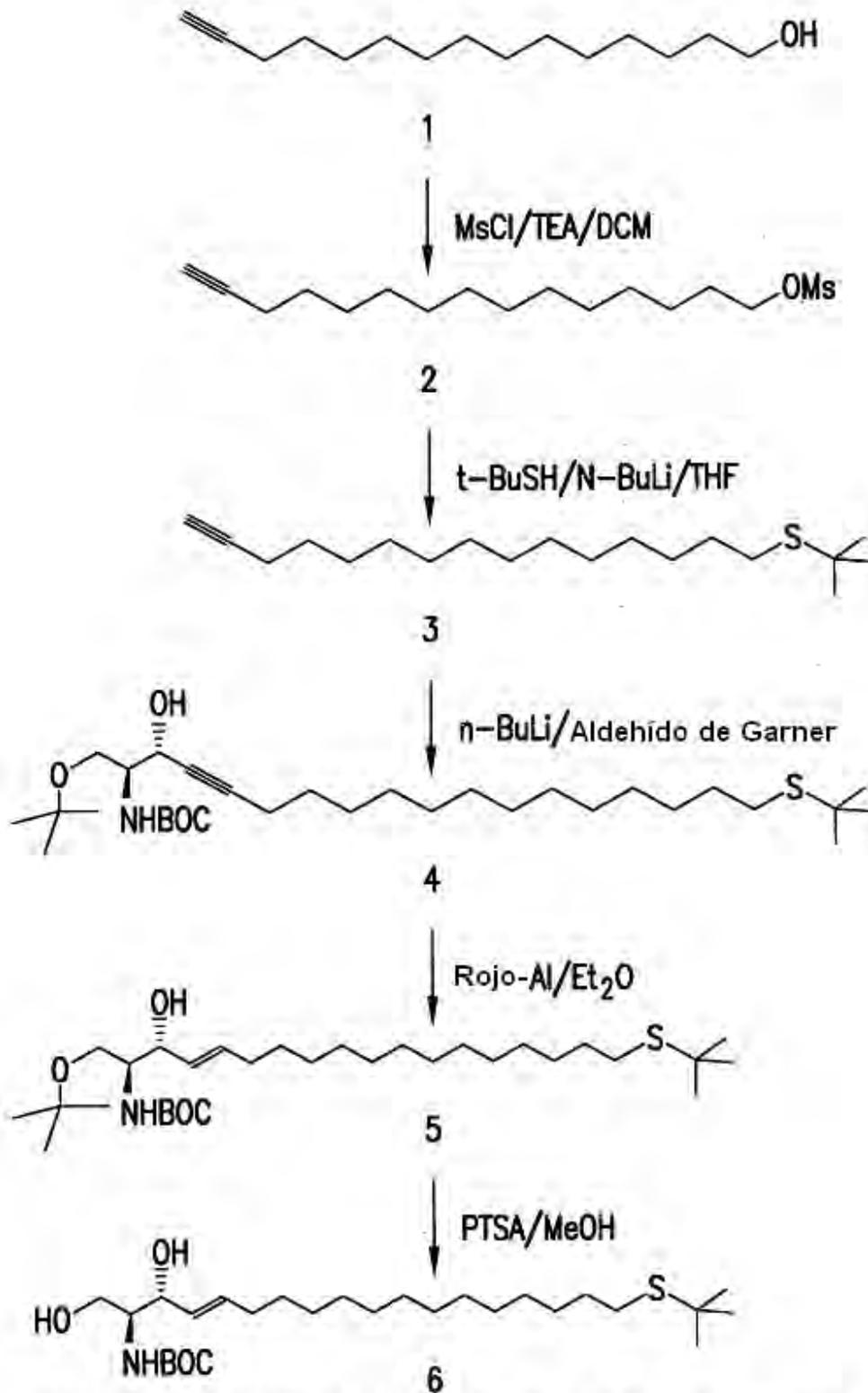
Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

His Arg Arg Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr
130

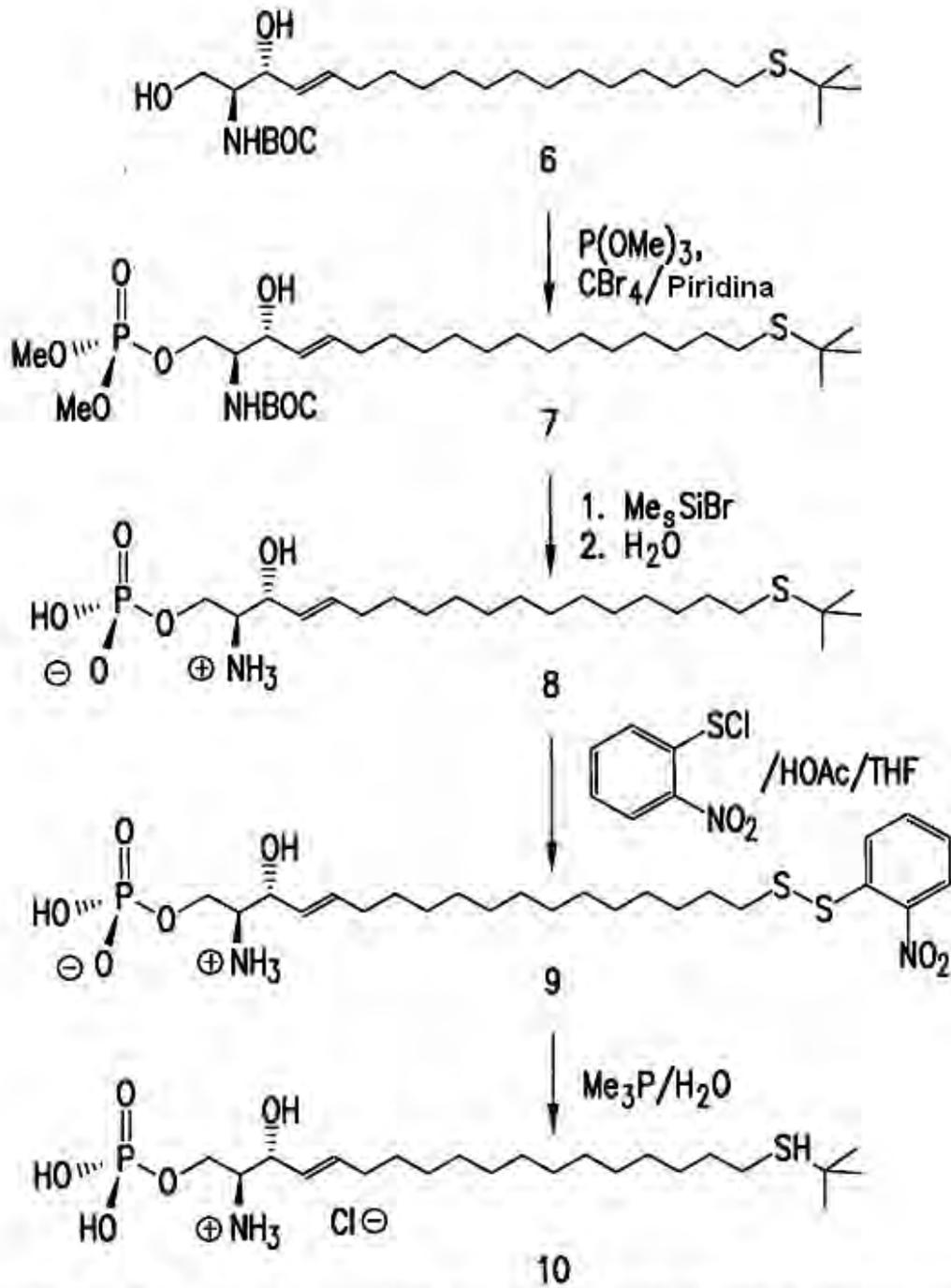
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno que se une al ácido lisofosfatídico (LPA) en condiciones fisiológicas y que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 56, 57, y 58 y un dominio variable de cadena ligera que comprende tres CDR de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 59, 60, y 61, en el que dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno opcionalmente:
- a. se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo madurado por afinidad, o un fragmento de unión a antígeno de cualquier anticuerpo de este tipo; y/o
- b. se conjuga con un resto seleccionado del grupo que consiste en un polímero, un radionúclido, un agente quimioterapéutico y un agente de detección.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras.
3. Una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 y un vehículo, opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o 2 o la composición de la reivindicación 3 para su uso en terapia.
5. El anticuerpo monoclonal o la composición para el uso de la reivindicación 4, donde el uso es para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con niveles anómalos de LPA, donde la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad hiperproliferativa, incluyendo cáncer; una enfermedad relacionada con el sistema inmunológico, incluyendo una enfermedad autoinmunitaria, rechazo a aloinjerto y enfermedad de injerto contra hospedador; una enfermedad neurodegenerativa; obesidad; diabetes de tipo 2; una enfermedad ocular, incluyendo degeneración macular; dolor; o una enfermedad asociada con angiogénesis o neovascularización anómalas; apoptosis; fibrogénesis o fibrosis opcionalmente fibrosis hepática, renal, pulmonar, cardíaca, uterina o cutánea, incluyendo esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis cutánea, fibrosis cardíaca y fibrosis hepática; reparación y curación de heridas; y una picadura de araña.
6. Un método para detectar ácido lisofosfatídico o un metabolito del mismo en una muestra, que comprende detectar en una muestra la unión del ácido lisofosfatídico, o un metabolito del mismo, con un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 en condiciones que permitan que el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno se una al LPA, si estuviera presente en la muestra, en el que:
- a. la muestra es opcionalmente una muestra derivada de animal seleccionada del grupo que consiste en una muestra de tejido, opcionalmente una muestra de biopsia, y una muestra de fluido corporal, seleccionada opcionalmente del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero, orina, semen, bilis, humor acuoso, humor vítreo, moco, fluido de lavado broncoalveolar y esputo; y/o
- b. el método comprende adicionalmente al menos uno de los siguientes:
- (i) detección de al menos un marcador de fibrosis; y/o
- (ii) comparar un nivel de LPA en la muestra con un nivel de referencia de LPA obtenido de un animal normal de la misma especie, en el que la presencia de un aumento del nivel de LPA con respecto al nivel de referencia se correlaciona con la presencia de enfermedad; y/o
- (iii) comparar un nivel de LPA en la muestra con un nivel deseado de LPA, y, si fuera necesario, alterar la dosificación terapéutica de un agente anti-LPA administrado.
7. Un kit de ELISA para su uso en la detección de LPA en una muestra, en el que el kit incluye un reactivo de diagnóstico que comprende un ácido lisofosfatídico derivatizado y un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el ácido lisofosfatídico derivatizado comprende un grupo de cabeza polar y al menos una cadena de hidrocarburo, en la que un átomo de carbono dentro de al menos una de dicha cadena de hidrocarburo está derivatizado con un grupo reactivo colgante opcionalmente protegido, y en el que el reactivo de diagnóstico comprende opcionalmente LPA tiolado conjugado con albúmina de suero bovino o con hemocianina de lapa californiana.



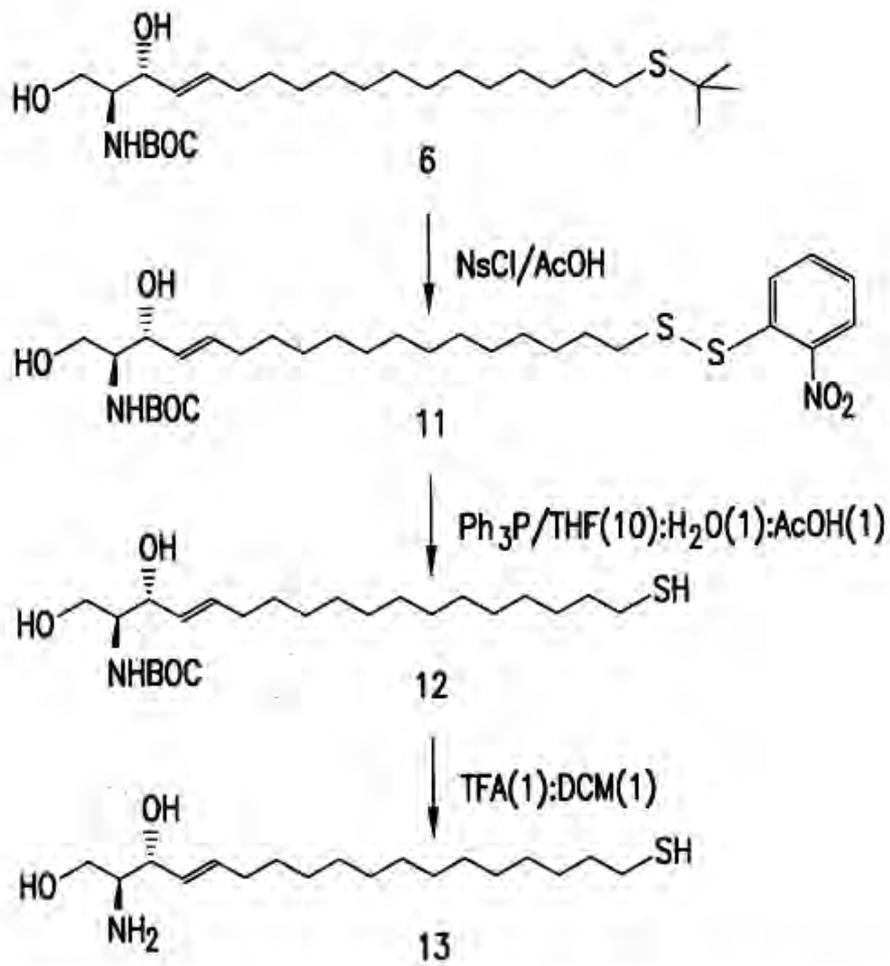
Síntesis de Antígeno Relacionada con S1P Tiolado Habitual

FIG. 1a



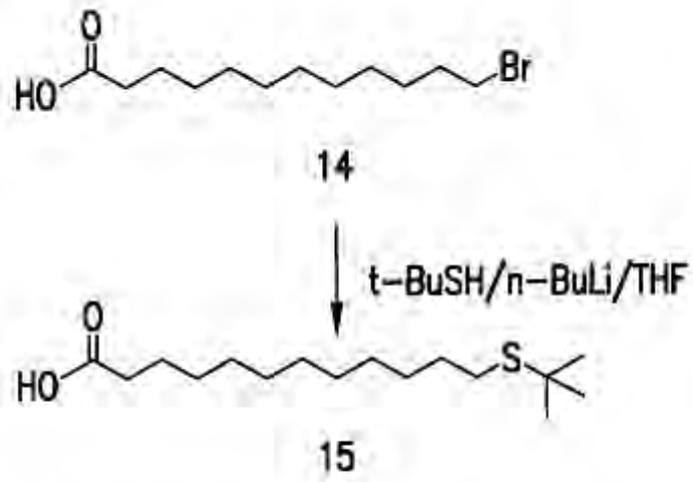
Síntesis de Antígeno Relacionada con S1P Tiolado Habitual (Continuación)

FIG. 1b



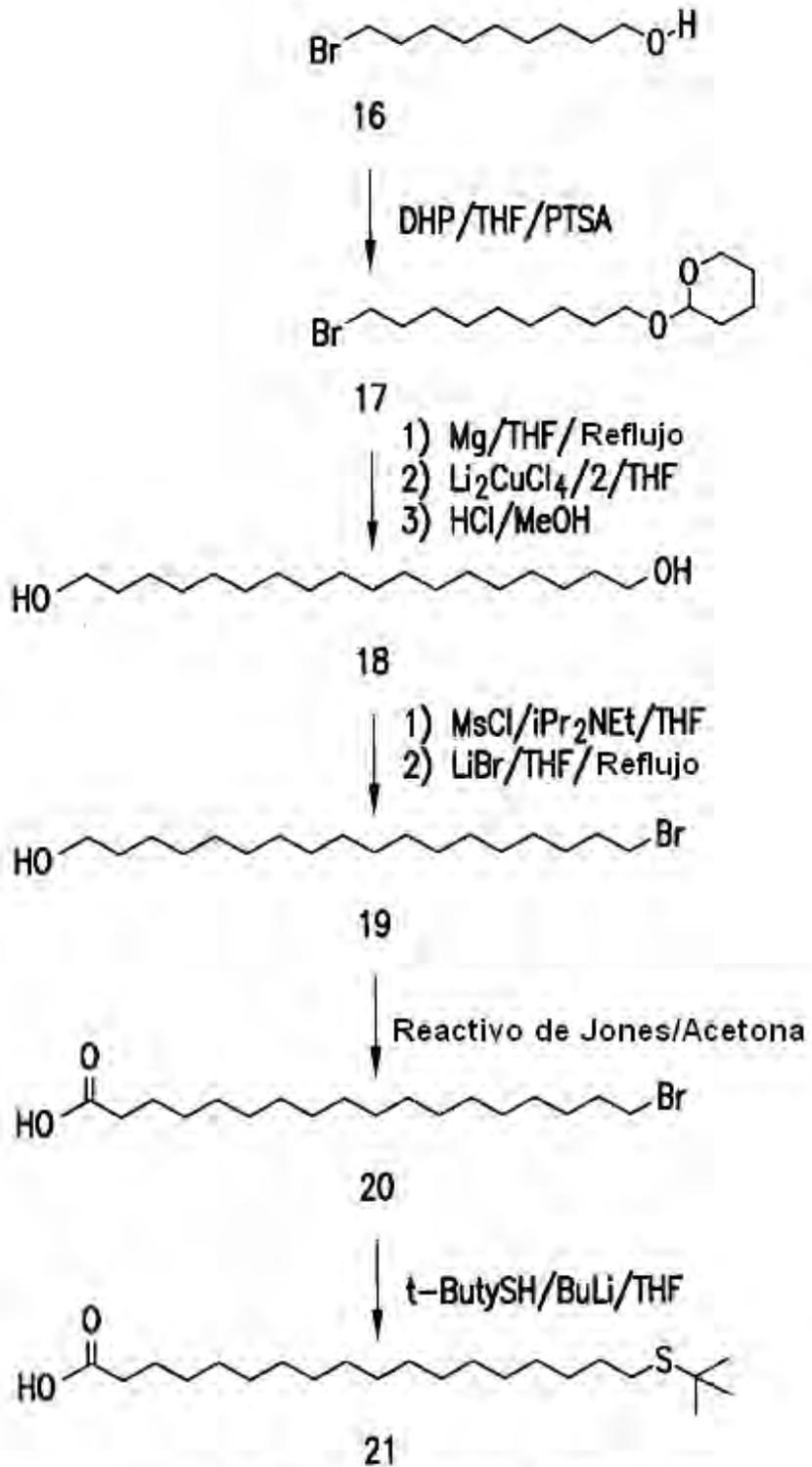
Síntesis de Antígeno Relacionada con S1P Tiolado Habitual (Continuación)

FIG. 1c



Síntesis de Ácido Graso Tiolado Protegido Habitual

FIG.2a



Síntesis de Ácido Graso Tiolado Habitual

FIG.2b

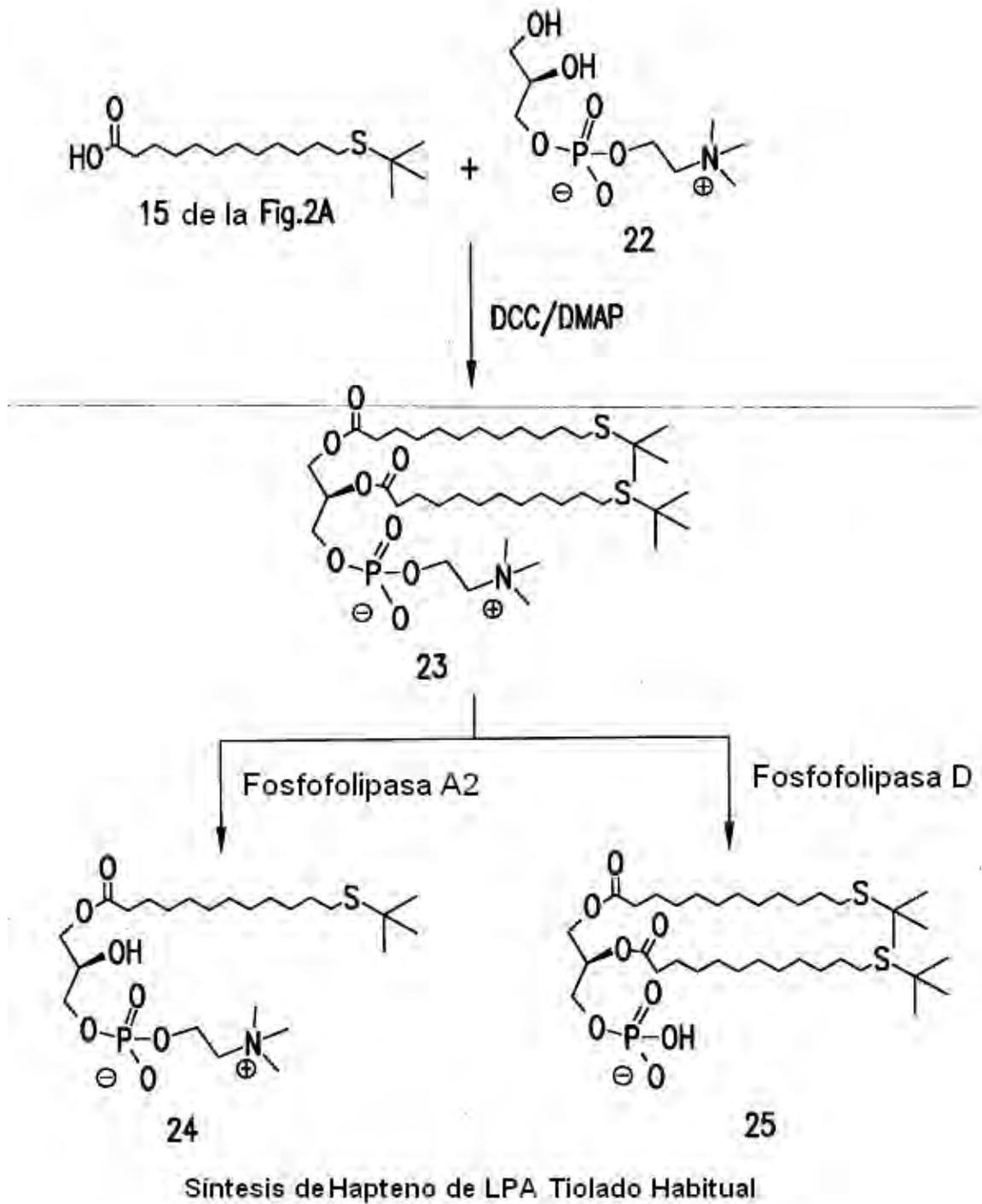
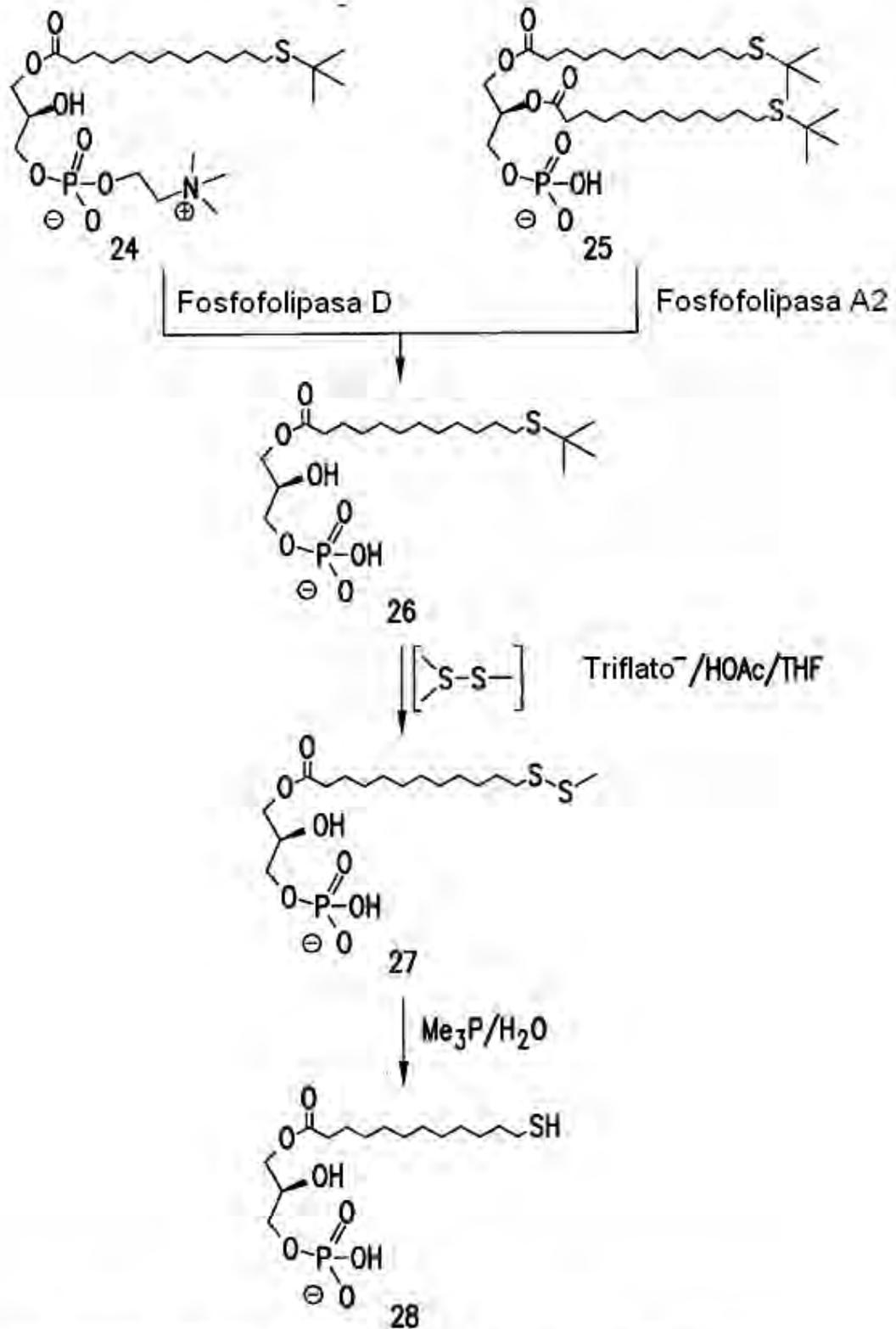


FIG.3a



Síntesis de Hapteno de LPA Tiolado Habitual (Continuación)

FIG.3b