

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 305**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2014 PCT/EP2014/001142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2014 E 14723706 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2992018**

54 Título: **Uso como diana del gangliosido GD2 O-acetilado como una nueva estrategia terapéutica y de diagnóstico para cáncer de células madre cancerosas**

30 Prioridad:

29.04.2013 EP 13002268

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

23.10.2019

73 Titular/es:

**OGD2 PHARMA (50.0%)
3, chemin du Pressoir Chênaie
44100 Nantes, FR y
UNIVERSITÉ DE NANTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BIRKLE, STÉPHANE;
COCHONNEAU, DENIS;
DORVILLIUS, MYLÈNE;
LE DOUSSAL, JEAN-MARC y
TERME, MICKAËL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 728 305 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

Uso como diana del gangliosido GD2 O-acetilado como una nueva estrategia terapéutica y de diagnóstico para cáncer de células madre cancerosas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos, composiciones farmacéuticas y su uso en métodos para tratar y/o diagnosticar cáncer de células madre cancerosas (abreviadamente en lo sucesivo CSC, por la expresión inglesa *Cancer Stem Cells*).

Antecedentes de la invención

Células madre cancerosas

- 10 Los avances en la investigación médica en estas últimas décadas permitieron mejorar de manera importante las estrategias existentes en la terapia del cáncer. Paralelamente al estudio y adaptación continuos de las estrategias terapéuticas convencionales, que incluyen quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y cirugía, aparecieron nuevos enfoques para el tratamiento del cáncer, denominados "terapias anti-cáncer dirigidas" y demostraron su eficacia y su interés en el mundo médico. Estas terapias dirigidas incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos tumorales, tales como trastuzumab (anti-Her2Neu), rituximab (anti-CD20) o bevacizumab (anti-VEGF), pero también inhibidores de la tirosina quinasa (por ejemplo, Imatinib, Erlotinib, Gefitinib), inhibidores de CDK, etc. Estas nuevas soluciones para el tratamiento del cáncer mejoraron en gran medida la vida de los pacientes con una mayor tasa de supervivencia y menores efectos secundarios en comparación con las estrategias más convencionales. Sin embargo, estas estrategias de terapia dirigida también muestran rápidamente límites, particularmente debido a la resistencia a dichos tratamientos, pero también a la especificidad de estas terapias dirigidas, que no son eficaces en todos los tipos de cáncer y pacientes. Estos fenómenos de resistencia conducen al fracaso del tratamiento, aparición de metástasis, recaídas y recidivas.

- 25 Los estudios han demostrado que la raíz de estas resistencias podría ser la presencia de células madre cancerosas (CSC), un pequeño subgrupo de células cancerosas que tienen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse, y desempeñar un papel primordial en la reaparición obstinada del cáncer y metástasis. De hecho, estas células madre cancerosas muestran una resistencia relativa a los tratamientos del cáncer, incluyendo la radiación y la quimioterapia. Además, solo una pequeña cantidad de estas células madre cancerosas es suficiente para iniciar un nuevo tumor y, por lo tanto, metástasis. Por lo tanto, un uso directo como diana de estas células madre cancerosas puede mejorar la eficacia de las estrategias actuales de terapia contra el cáncer.

- 30 Las células madre cancerosas y los mecanismos asociados se han estudiado ampliamente. Se han investigado métodos para identificar dichas células madre cancerosas y se encontraron pocos marcadores de CSC. Desafortunadamente, todavía no hay un antígeno identificado como marcador de las CSC que sea útil en muchos tipos de tumores. Los ejemplos de marcadores de CSC utilizados actualmente incluyen ALDH, CD133, CD44, CD24, CD166. Muchos fenotipos diferentes se han identificado como fenotipos de CSC en diferentes tipos de cánceres. En particular, el CD133, que ahora se usa ampliamente como marcador de células madre cancerosas, parece ser un buen marcador de CSC en el glioma.

- 35 Hoy en día, el fenotipo celular CD133⁺ está relacionado con las células madre cancerosas en el glioma; el fenotipo CD44⁺ CD24^{-/bajo} parece estar relacionado con las células madre cancerosas en el cáncer de mama; el fenotipo CD34⁺ parece estar relacionado con células madre cancerosas en leucemia, más particularmente, CD34⁺/CD38 está relacionado con células madre cancerosas en la leucemia mieloide aguda y el fenotipo CD34⁺/CD19⁺ parece estar relacionado con células madre cancerosas en la leucemia linfocítica aguda.

- 45 Desafortunadamente, la mayoría de los marcadores de CSC conocidos se expresan también en algunos tejidos normales. Por lo tanto, sería de gran interés identificar marcadores de cáncer específicos que podrían usarse como marcadores de CSC de diagnóstico y terapéuticos: podrían ser usados como dianas para el diagnóstico, pero también para tratar cánceres que comprenden células madre cancerosas, denominado en este documento cáncer de células madre cancerosas (cáncer de CSC), sin efectos secundarios importantes debido a la toxicidad para células sanas.

Sumario de la invención

- 50 Los inventores ya demostraron que los cánceres de origen neuroectodérmico expresan específicamente el gangliosido GD2 O-acetilado y que se puede administrar un anticuerpo terapéutico dirigido al gangliosido GD2 O-acetilado y mostrar efectos beneficiosos sin neurotoxicidad, especialmente debido a la ausencia de expresión de este antígeno cancerígena en las células sanas, especialmente en los nervios periféricos.

- 55 Para tal fin, los inventores crearon un anticuerpo que reconocía el gangliosido GD2 O-acetilado y no reconocía el gangliosido GD2, para uso en el tratamiento de cánceres que expresaban GD2 O-acetilado, en particular neuroblastomas, melanomas, glioblastomas o cánceres de pulmón de células pequeñas (documento FR 2 906 808 A1).

Ahora y sorprendentemente, los inventores muestran que la expresión del gangliósido GD2 O-acetilado está enriquecida en células madre cancerosas y podría ser una diana para el tratamiento del cáncer de CSC.

De este modo, los inventores proponen que el gangliósido GD2 O-acetilado sea una diana para el tratamiento del cáncer de CSC, utilizando el anticuerpo 8B6 (y sus derivados) que es específico del gangliósido GD2 O-acetilado.

5 En sus estudios, demuestran que este anticuerpo muestra una potente actividad citotóxica intrínseca contra las células tumorales, incluida la citotoxicidad directa para las células madre cancerosas a través de la apoptosis u otras vías de muerte celular, además de los efectos inmunitarios, incluyendo CDC y ADCC.

10 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que reconoce el gangliósido GD2 O-acetilado, o uno de sus fragmentos funcionales, para el tratamiento del cáncer de células madre del cáncer (CSC), comprendiendo dicho anticuerpo:

a) una cadena ligera que comprende al menos un marco de región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad definidas por las secuencias SEQ ID NO:1 para CDR-L1, SEQ ID NO:2 para CDR-L2, SEQ ID NO:3 para CDR-L3, y/o

15 b) una cadena pesada que comprende al menos un marco de región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad definidas por las secuencias SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEC ID NO:5 para CDR-H2, SEQ ID NO:6 para CDR-H3.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método para tratar el cáncer de CSC, comprendiendo dicha composición farmacéutica un anticuerpo de la invención.

20 La presente invención se refiere además a un método para diagnosticar un cáncer de CSC en un sujeto, en el que dicho método comprende determinar la expresión del gangliósido GD2 O-acetilado, y en donde una expresión de gangliósido GD2 O-acetilado es indicativa de un cáncer de CSC.

La invención también se refiere al uso del gangliósido GD2 O-acetilado como un biomarcador del cáncer de CSC.

25 La invención finalmente se refiere a un método para predecir la respuesta de un sujeto afectado con cáncer de CSC a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de la invención, en donde dicho método comprende detectar la presencia de células que expresan el gangliósido GD2 O-acetilado en una muestra biológica de dicho sujeto.

Descripción de los dibujos

30 **Figura 1: Imágenes representativas de un corte de tumor glioblastoma** teñido con el anticuerpo IgG3 de control como control negativo (A); corte de tumor neuroblastoma teñido con mAb 8B6 (B). Las muestras de los tumores glioblastoma se puntuaron 1+(C), 2+(D), 3+(E) y 4+(E) de acuerdo con la tinción con el mAb 8B6 de intensidad específica.

35 **Figura 2: OAcGD2 identifica el fenotipo de células madre CD133⁺ en células de cáncer glioblastoma humano.** UL, cuadrante superior izquierdo, células de glioblastoma humano OAcGD2⁺ U87MG; UR, cuadrante superior derecho, células de glioblastoma humano CD133⁺ OAcGD2⁺ U87MG; LL, cuadrante inferior izquierdo, células de glioblastoma humano CD133⁻ OAcGD2⁻ U87MG; LR, cuadrante inferior derecho, células de glioblastoma humano CD133⁺ U87MG.

Figura 3: Examen microscópico de contraste de fases de células de glioblastoma humano U87MG expuestas a 50 µg/mL de anticuerpo de control o mAb 8B6. Después de un período de incubación de 24 horas, las células apoptósicas evaluadas por cambios morfológicos se observaron bajo un microscopio de contraste de fases con los mismos aumentos 200. La flecha indica célula apoptósica.

40 **Figura 4: El mAb anti-OAcGD2 inhibe el crecimiento de tumores glioblastoma humano en ratones.**

Figura 5: Citotoxicidad de anticuerpos anti-GD2 y anti-OAcGD2 en células de cáncer de mama. La citotoxicidad directa se evalúa por el ensayo MTT con concentraciones crecientes de anticuerpos anti-GD2 (10B8) y anti-OAcGD2 (8B6) de muridos.

45 **Figura 6: Expresión de OAcGD2 en CSC en cáncer de pulmón de células pequeñas.** Perfiles de expresión en citometría de flujo para las líneas de células H196 de CD133 (CSC) simultáneamente con OAcGD2 (8B6) o GD2 (10B8).

Descripción detallada de la invención

Estrategias terapéuticas de la invención

50 El primer objeto de la invención se refiere a un anticuerpo que reconoce el gangliósido GD2 O-acetilado, o uno de sus fragmentos funcionales, para el tratamiento del cáncer de células madre cancerosas (CSC), comprendiendo dicho anticuerpo:

- 5 a) una cadena ligera que comprende al menos un marco de región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO:1 para CDR-L1, SEQ ID NO:2 para CDR-L2, SEQ ID NO 3 para CDR-L3, y/o
- b) una cadena pesada que comprende al menos un marco de región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO:4 para CDR-H1, SEQ ID NO:5 para CDR-H2, SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

SEQ ID NO:1	QSLKNNNGNTFL
SEQ ID NO:2	KVS
SEQ ID NO:3	SQSTHIPPY
SEQ ID NO:4	EFTFTDYY
SEQ ID NO:5	IRNRANGYTT
SEQ ID NO:6	ARVSNWAFDY

Dichas CDR se definen de acuerdo con la nomenclatura IMGT que es bien conocida en la técnica (The International Immunogenetics Information System®, LEFRANC et al., *Nucleic Acids Research*, vol. 27, p: 209-212, 1999).

10 El término "anticuerpo" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una molécula de inmunoglobulina correspondiente a un tetrámero que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) idénticas (aproximadamente 50-70 kDa cuando son de longitud completa) y dos cadenas ligeras (L) idénticas (aproximadamente 25 kDa cuando son de longitud completa) interconectadas por enlaces disulfuro. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Cada cadena pesada se compone de una región variable de la cadena pesada en el extremo N (abreviada aquí HCVR) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios (CH1, CH2 y CH3) y una región de bisagra para IgG, IgD e IgA; y 4 dominios (CH1, CH2, CH3 y CH4) para IgM e IgE. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera en el extremo N (abreviada en este documento LCVR) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada HCVR y LCVR se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con convenciones muy conocidas. La capacidad funcional del anticuerpo para unirse a un antígeno particular depende de las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada, y está determinada en gran medida por las CDR.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención comprende:

- 30 a) una cadena ligera que comprende un marco de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO:1 para CDR-L1, SEQ ID NO:2 para CDR-L2, SEQ ID NO:3 para CDR-L3, y/o
- b) una cadena pesada que comprende un marco de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO:4 para CDR-H1, SEQ ID NO:5 para CDR-H2, SEQ ID NO:6 para CDR-H3.

35 En una realización más particular, el anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8. Dicho anticuerpo es el anticuerpo 8B6.

SEQ ID NO:7	DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLK KNNNGNTFLHW YLQKSGQSPK LLIYKVSNRL SGVPDRFSGS GSGTYFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHIP YTFGGGTKLE IK
SEQ ID NO:8	EVKLVESGGG LVLPGDSLRL SCATSEFTFT DYYMTWVRQP PRKALEWLGK IRNRANGYTT EYNPSVKGRF TISRDNSQSI LYLQMNTLRT EDSATYYCAR VSNWAFDYWG QGTTLTVSS

El término "anticuerpo", como se usa en esta memoria, se refiere a un anticuerpo monoclonal *per se*. Un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado.

5 El término "fragmento funcional", como se usa en esta memoria, se refiere a un fragmento de anticuerpo capaz de reconocer el gangliósido GD2 O-acetilado. Dichos fragmentos pueden ser identificados o producidos simplemente por el experto en la técnica y comprenden, como ejemplo, un fragmento F_{ab} (que se puede producir por digestión con papaína), un fragmento $F_{ab'}$ (que se puede producir por digestión con pepsina y reducción parcial), un fragmento $F_{(ab)2}$ (que se puede producir por digestión con pepsina), un fragmento F_{acb} (que se puede producir por digestión con plasmína), pero también un fragmento scF_v (F_v de una sola cadena, producido por técnicas de biología molecular),
10 diacuerpos y monocuerpos .

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH - VL). Preferiblemente, usando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno.
15

El término "monocuerpos", como se usa en esta memoria, se refiere a moléculas de unión a antígeno con un dominio variable de cadena pesada y ningún dominio variable de cadena ligera. Un monocuerpo se puede unir a un antígeno en ausencia de cadena ligera y típicamente tiene tres regiones CDR designadas CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Los monocuerpos incluyen "monocuerpos de camélidos", tales como los fragmentos de VHH obtenidos de una fuente animal de la familia de los camélidos, incluyendo los animales con patas con dos dedos y plantas de cuero. Los animales en la familia de los camélidos incluyen camellos, llamas y alpacas. Se ha informado que los camellos (*Camelus dromedaries* y *Camelus bactrianus*) a menudo carecen de dominios variables de cadenas ligeras cuando se analiza el material de su suero, lo que sugiere que se puede derivar suficiente especificidad y afinidad de los anticuerpos a partir de los dominios VH (tres bucles de CDR) solo. Los monocuerpos también incluyen VH modificado de diversas fuentes animales, en particular mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, caballo, burro, bovino o humano), que se puede unir a un antígeno en ausencia de VL. Preferiblemente, el VH se modifica en posiciones en la interfaz VL para proporcionar la unión del VH al antígeno en ausencia del VL. Un experto en la técnica es capaz de optimizar un VH humano por la sustitución de algunos residuos importantes (por "camelización") para imitar cadenas pesadas de anticuerpos de camélidos naturalmente desprovistas de parejas de cadenas ligeras.
20
25
30 Esto permite obtener fragmentos funcionales de anticuerpos con propiedades de estabilidad y niveles de expresión similares a los de VHH de camélidos, mientras se mantienen las propiedades de reconocimiento del fragmento de anticuerpo, que incluyen alta afinidad y alta especificidad y disminución de la inmunogenicidad.

Dichos fragmentos se pueden producir por escisión enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, como se conoce en la técnica y/o como se describe en esta memoria. Los anticuerpos también se pueden producir en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de parada aguas arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, un gen de combinación que codifica una porción de cadena pesada $F_{(ab)2}$ se puede diseñar para incluir secuencias de DNA que codifican el dominio CH1 y/o la región de bisagra de la cadena pesada. Las diversas porciones de anticuerpos se pueden unir químicamente por técnicas convencionales o se pueden preparar como una proteína contigua utilizando técnicas de ingeniería genética.
35
40

En una realización particular, la invención se refiere a un fragmento funcional de un anticuerpo de la invención en el que dicho fragmento se elige entre el grupo que comprende o consiste en F_{ab} , $F_{ab'}$, $F_{(ab)2}$, F_{acb} , F_d , scF_v , diacuerpos y monocuerpos que incluyen fragmentos VHH y fragmentos VH humanos.

De acuerdo con la invención, dicho fragmento funcional es capaz de reconocer el gangliósido GD2 O-acetilado.

45 Preferiblemente un fragmento funcional del anticuerpo de la invención retiene una actividad equivalente, particularmente una actividad citotóxica equivalente, a la de un anticuerpo de la invención.

La expresión "reconocer el gangliósido GD2 O-acetilado" significa que el anticuerpo de la invención es capaz de unirse al gangliósido GD2 O-acetilado con una afinidad de menos de 10^{-7} M, preferiblemente menos de 5×10^{-8} M y más preferiblemente menos de 10^{-8} M.

50 Preferiblemente, pero no necesariamente, los anticuerpos útiles en la invención se producen de forma recombinante, ya que se requiere la manipulación de los anticuerpos típicamente de muridos u otros no humanos con la especificidad apropiada para convertirlos en forma humanizada. Los anticuerpos pueden o no estar glicosilados, aunque se prefieren los anticuerpos glicosilados. Los anticuerpos están adecuadamente reticulados por enlaces disulfuro, como es bien sabido.
55

Como se entiende bien en la técnica, los anticuerpos monoclonales se pueden generar fácilmente con una especificidad apropiada por técnicas estándares de inmunización de mamíferos que lo producen. Estas secuencias de nucleótidos se pueden manipular para proporcionarlas en forma humanizada.

Por "anticuerpo quimérico" se entiende un anticuerpo que está compuesto de regiones variables de una inmunoglobulina de murido y de regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Esta alteración consiste simplemente en sustituir la región constante de murido por la región constante de un anticuerpo humano, lo que da como resultado una quimera humana/múrida que puede tener una inmunogenicidad suficientemente baja para ser aceptable para uso farmacéutico.

Hasta ahora se han descrito varios métodos para producir tales anticuerpos quiméricos, que forman parte del conocimiento general del experto en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.225.539).

Por "anticuerpo humanizado" se entiende un anticuerpo que está compuesto parcial o totalmente por secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de un anticuerpo humano, alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas. Esta humanización de la región variable del anticuerpo y, finalmente, la CDR se realiza por métodos que ahora son bien conocidos en la técnica.

Como ejemplo, la Solicitud de Patente Británica GB 2188638A y la Patente de Estados Unidos N° 5.585.089 describen procesos en los que se producen anticuerpos recombinantes en los que la única porción del anticuerpo que está sustituida es la región determinante de la complementariedad, o "CDR". La técnica de injerto de CDR se ha utilizado para generar anticuerpos que consisten en CDR de muridos, y el marco de la región variable humana y las regiones constantes (véase, por ejemplo, RIECHMANN *et al.*, *Nature*, vol.332, p: 323-327, 1988). Estos anticuerpos conservan las regiones constantes humanas que son necesarias para la función efectora dependiente de Fc, pero tienen mucha menos probabilidad de provocar una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo.

Como ejemplo, las regiones de marco de las regiones variables están sustituidas por las regiones de marco humanas correspondientes dejando la CDR no humana sustancialmente intacta, o incluso reemplazando la CDR con secuencias derivadas de un genoma humano (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente US 2006/0258852 A1). Los anticuerpos totalmente humanos se producen en ratones modificados genéticamente cuyos sistemas inmunitarios se han alterado para corresponder a los sistemas inmunitarios humanos. Como se mencionó anteriormente, es suficiente para su uso en los métodos de la invención, emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, incluyendo fragmentos que representan formas de una sola cadena.

Un anticuerpo humanizado se refiere de nuevo a un anticuerpo que comprende un marco humano, al menos una CDR de un anticuerpo no humano, y en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85 o 90%, preferiblemente al menos 95% idéntica. Por lo tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana natural. Por ejemplo, una inmunoglobulina humanizada típicamente no abarcaría un anticuerpo quimérico de región variable de ratón/región constante humana.

Los anticuerpos humanizados tienen al menos tres ventajas potenciales sobre los anticuerpos no humanos y quiméricos para uso en terapia humana:

- 1) Debido a que la porción efectora es humana, puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano (por ejemplo, destruir las células diana de manera más eficaz por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)).
- 2) El sistema inmunitario humano no debe reconocer como extraño el marco o la región C del anticuerpo humanizado, y, por lo tanto, la respuesta del anticuerpo contra dicho anticuerpo inyectado debe ser menor que contra un anticuerpo no humano totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño.
- 3) Se ha informado que los anticuerpos no humanos inyectados tienen una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados inyectados tendrán una semivida esencialmente idéntica a los anticuerpos humanos de origen natural, lo que permite administrar dosis más pequeñas y menos frecuentes.

Como ejemplo, el diseño de inmunoglobulinas humanizadas se puede llevar a cabo de la siguiente manera: cuando un aminoácido está dentro de la siguiente categoría, el aminoácido de marco de una inmunoglobulina humana que se va a usar (inmunoglobulina aceptora) se reemplaza por un aminoácido de marco de una inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR (inmunoglobulina donadora): (a) el aminoácido en la región de marco humana de la inmunoglobulina aceptora es inusual para la inmunoglobulina humana en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente de la inmunoglobulina donadora es típico de la inmunoglobulina humana en esa posición; (b) la posición del aminoácido está inmediatamente adyacente a una de las CDR; o (c) cualquier átomo de cadena lateral de un aminoácido de marco está dentro de aproximadamente 5-6 Å (centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido de una CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional (QUEEN *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.88, p: 2869, 1991). Cuando cada uno de los aminoácidos en la región de marco humana de la inmunoglobulina aceptora y un aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es inusual para la inmunoglobulina humana en esa posición, dicho aminoácido se reemplaza por un aminoácido típico de la inmunoglobulina humana en esa posición.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo quimérico.

En una realización preferida, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico y las secuencias de marco de las cadenas ligera y pesada son de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina de ratón, respectivamente.

Preferiblemente, dicho anticuerpo quimérico comprende además las regiones constantes de las cadenas ligeras y pesadas humanas.

5 De acuerdo con la invención, un anticuerpo quimérico de la invención es capaz de reconocer el gangliósido GD2 O-acetilado.

Preferiblemente, un anticuerpo quimérico de la invención retiene una actividad equivalente, particularmente una actividad citotóxica equivalente, a la de un anticuerpo de la invención.

10 Ventajosamente, dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:9.

De nuevo ventajosamente, dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10.

15 En una realización más preferida, dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:9	DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLL KNNGNTFLHW YLQKSGQSPK LLIYKVS NRL SGVPDRFSGS GSGTYFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHIP YTFGGGTKLE IK
SEQ ID NO:10	EVKLVESGGG LVLPGDSLRL SCATSEFTFT DYYMTWVRQP PRKALEWLG F IRNRANGYTT EYNPSVKGRF TISRDN S QSI LYLQMNTLRT EDSATYYCAR VSNWAFDYWG QGTTTLTVSS

En otra realización particular, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado.

En otra realización preferida, dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado y las secuencias de marco de las cadenas ligera y pesada proceden de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina humanizada respectivamente.

20 Preferiblemente, un anticuerpo humanizado de la invención comprende además las regiones constantes de las cadenas ligeras y pesadas humana.

Según la invención, un anticuerpo humanizado de la invención es capaz de reconocer el gangliósido GD2 O-acetilado.

25 Preferiblemente, un anticuerpo humanizado de la invención retiene una actividad equivalente, particularmente una actividad citotóxica equivalente, a la de un anticuerpo de la invención.

Otras secuencias son posibles para las cadenas ligera y pesada para los anticuerpos humanizados de la presente invención. Las inmunoglobulinas pueden tener dos pares de complejos de cadena ligera/cadena pesada, comprendiendo al menos una cadena una o más regiones determinantes de la complementariedad de ratón unidas funcionalmente a los segmentos de la región de marco humana.

30 Los anticuerpos de la invención abarcan inmunoconjugados.

Como se usa en esta memoria, el término "inmunoconjugado" se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales, unido a una segunda molécula, preferiblemente un agente citotóxico o un radioisótopo. Preferiblemente, dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales está unido a dicha segunda molécula por enlace covalente.

35 En una realización, el anticuerpo de la invención es un inmunoconjugado.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención es un inmunoconjugado, en donde dicho inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención o uno de sus fragmentos funcionales y un agente citotóxico.

En otra realización particular, el anticuerpo de la invención es un inmunocombinado en el que dicho inmunocombinado comprende un anticuerpo de la invención o uno de sus fragmentos funcionales y un radioisótopo.

El término "cáncer de células madre cancerosas" o "cáncer de CSC" se refiere a un cáncer que comprende células particulares conocidas como células madre cancerosas.

5 En una realización, un cáncer de CSC comprende al menos el 0,1% de células madre cancerosas; preferiblemente, un cáncer de CSC comprende de 1% a 95% de células madre cancerosas, más preferiblemente un cáncer de CSC comprende de 1% a 50% de células madre cancerosas

10 El término "células madre cancerosas" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una subpoblación de células cancerosas (que se encuentran dentro de los tumores sólidos y los cánceres hematológicos) que poseen características asociadas con las células madre normales, específicamente la capacidad de dar origen a todos los tipos de células encontrados en una muestra particular de cáncer. Tienen la capacidad de auto-renovación, diferenciación en múltiples linajes de células cancerosas y proliferación extensiva. Pueden iniciar un nuevo tumor con solo una pequeña cantidad de células madre cancerosas y tienden a ser resistentes a la terapia convencional, incluida la quimioterapia y la radioterapia.

15 Por lo tanto, usando las CSC como diana, el anticuerpo antiOAcGD2 permite prevenir y/o tratar la metástasis resultante de estas CSC.

20 Estas células madre cancerosas se pueden aislar de tumores por marcadores de superficie, tales como CD133, CD44, CD34, CD24, ALDH1; estos marcadores permiten distinguir las células madre cancerosas entre la mayor parte de las células de cáncer. Actualmente se conocen varios métodos en la técnica para aislar específicamente células madre cancerosas *in vitro*, incluyendo los marcadores específicos de los métodos ampliamente utilizados o el aislamiento basado en la tinción de Hoechst, pero también el aislamiento basado en la quimio-resistencia, la heterogeneidad de la clasificación de la invasividad y, en células de cáncer de mama metastásicas, clasificación por reoxigenación después de la exposición a ciclos repetitivos de hipoxia.

25 Las células madre cancerosas se han identificado en muy diferentes tipos de cánceres, incluyendo, aunque sin limitación, leucemia que incluye leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica aguda, cáncer de mama, glioma que incluye glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de vejiga o cáncer gástrico.

30 Por lo tanto, en una realización de la invención, el cáncer de CSC de la invención se elige entre el grupo que comprende o consiste en leucemia que incluye leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica aguda, cáncer de mama, glioma que incluye glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de vejiga o cáncer gástrico.

En una realización preferida, dicho cáncer de CSC es glioma, cáncer de mama, leucemia linfocítica aguda o leucemia mieloide aguda.

35 Se han observado diferentes marcadores que identifican células madre cancerosas entre la mayoría de las células de cáncer, variando dichos marcadores y dependiendo del tipo de cáncer.

Los ejemplos de marcadores que pueden usarse para identificar el cáncer de CSC incluyen, aunque sin limitación, CD34, CD38, CD19, de interleuquina-3-receptor α (CD123), CD33, CD44, CD44v6, CD47, CD24, EpCAM (ESA), Lin, CD133, A2B5, SSEA-1, CD166, CD26, CD200, $\alpha 2\beta 1$, Sca, CD45, Pecam, ALDH, ALDH1, Oct4, ABCG2, CXCR4, AFP, EMA, IGF-IR.

40 Sin embargo, se debe tener en cuenta que los marcadores de células madre cancerosas conocidos se pueden usar para identificar el cáncer de CSC, pero no son adecuados como antígeno diana para tratar dicho cáncer, ya que se expresan principalmente en tejidos sanos.

Algunos ejemplos de fenotipos de células madre cancerosas comprenden los fenotipos descritos en la Tabla 1:

Tabla 1: Biomarcadores y/o fenotipos de diferentes células madre cancerosas

Tipo de cáncer	Biomarcadores y/o fenotipos de las CSC
Leucemia mieloide aguda	CD34 ⁺ /CD38 ⁻ interleuquina-3-receptor α ⁺ CD33 ⁺

Leucemia linfóide aguda	CD34 ⁺ /CD19 ⁺ CD34 ⁺ /CD19 ⁻ CD34 ⁺ /CD38 ⁺ /CD19 ⁺ CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD19 ⁺ interleuquina-3-receptor α^+ CD33 ⁺ CD133 ⁺ /CD38 ⁻ CD133 ⁺ /CD19 ⁻
Cáncer de mama	CD44 ⁺ /CD24 ^{-bajo} CD44 ⁺ /CD24 ^{-bajo} /ESA ⁺ CD44 ⁺ /CD24 ^{-bajo} /lin ⁻ /ALDH1 ⁺
Cáncer glioma	CD133 ⁺ A2B5 ⁺ SSEA-1 ⁺
Cáncer colorrectal	CD133 ⁺ /ESA ^{alto} /CD44 ⁺ CD166 ⁺ CD26 ⁺
Cáncer de páncreas	CD133 ⁺ CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /ESA ⁺
Cáncer de próstata	CD44 ⁺ /CD133 ⁺ / α 2 β 1 ⁺ CD44 ⁺
Cáncer de pulmón	Sca ⁺ /CD45 ⁻ /Pecam ⁻ /CD34 ⁺ ALDH1 ⁺ /Oct4 ⁺ /CD133 ⁺ /ABCG2 ⁺ /CXCR4 ⁺
Cáncer de hígado	CD133 ⁺ /CD44 ⁺ EpCAM ⁺ /AFP ⁺
Cáncer de vejiga	EMA ⁻ /CD44v6 ⁺
Cáncer gástrico	CD133 ⁺ /CD44 ⁺ CD44 ⁺ , CD133 ⁺ /CD44 ⁺ /ALDH1 ⁺

5 Por lo tanto, en una realización, dicho cáncer de CSC comprende células que tienen al menos un fenotipo elegido entre el grupo que comprende o consiste en: CD34⁺/CD38⁻, CD34⁺/CD19⁻, CD34⁺/CD19⁺, CD34⁺/CD38⁺/CD19⁺, CD34⁺/CD38⁻/CD19⁺, CD133⁺/CD38⁻, CD133⁺/CD19⁻, interleuquina-3-receptor α^+ , CD33⁺, CD44⁺/CD24^{-bajo}, CD44⁺/CD24⁺/ESA⁺, CD44⁺/CD24^{bajo}/lin⁻/ALDH⁺, CD133⁺, A2B5⁺, SSEA-1⁺, CD133⁺/ESA^{alto}/CD44⁺, CD166⁺, CD26⁺, CD44⁺/CD133⁺/ α 2 β 1⁺, CD44⁺, Sca⁺/CD45⁻/Pecam⁻/CD34⁺, ALDH1⁺/Oct4⁺/CD133⁺/ABCG2⁺/CXCR4⁺, CD133⁺/CD44⁺, EpCAM⁺/AFP⁺, EMA⁻/CD44v6⁺, CD133⁺/CD44⁺/ALDH1⁺.

En una realización de la invención, el cáncer de CSC de la invención comprende células CD133⁺.

10 En otra realización, el cáncer de CSC de la invención comprende células CD44⁺. En una realización más particular, el cáncer de CSC de la invención comprende células CD44⁺/CD24^{-bajo}.

En otra realización más, el cáncer de CSC de la invención comprende CD34⁺.

En una realización más particular, el cáncer de CSC de la invención comprende células CD34⁺/CD38⁻.

En otra realización más particular, el cáncer de CSC de la invención comprende células CD34⁺/CD19⁺, preferiblemente células CD34⁺/CD38⁺/CD19⁺ o CD34⁺/CD38⁻/CD19⁺.

- 5 En una realización preferida de la invención, un cáncer de CSC de la invención se caracteriza por una subpoblación de células madre cancerosas en la que al menos el 10% de las células madre cancerosas presentan el gangliósido GD2 O-acetilado en su superficie, preferiblemente al menos el 30% de células madre cancerosas, y más preferiblemente al menos el 50% de las células madre cancerosas presentan el gangliósido GD2 O-acetilado en su superficie.
- En una realización particular de la invención, dicho cáncer de CSC es cáncer de mama.
- En una realización más particular, dicho cáncer de CSC es cáncer de mama en el que las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo}.
- En otra realización particular de la invención, dicho cáncer de CSC es glioma.
- 10 En una realización más particular, dicho cáncer de CSC es un glioma en el que las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD133⁺.
- En otra realización particular de la invención, dicho cáncer de CSC es leucemia, más particularmente leucemia mieloide aguda o leucemia linfocítica aguda.
- 15 En una realización más particular, dicho cáncer de CSC es leucemia en donde las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD34⁺, más particularmente dicho cáncer de CSC es leucemia mieloide aguda en donde las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD34⁺/CD38⁻ o leucemia linfocítica aguda en donde las células madre se caracterizan por un fenotipo CD34⁺/CD19⁺, preferiblemente un fenotipo CD34⁺/CD19⁺/CD38⁻ o CD34⁺/CD19⁺/CD38⁺.
- 20 En el contexto de la invención, el término "tratar el cáncer de CSC" significa revertir, aliviar, inhibir el progreso o la propagación del cáncer de CSC y/o la metástasis. El término también abarca la prevención del cáncer de CSC, la metástasis o la recidiva del cáncer de CSC. Preferiblemente, tal tratamiento también conduce a la regresión del crecimiento del tumor, es decir, la disminución del tamaño de un tumor medible. Típicamente, tal tratamiento conduce a una prolongación de la supervivencia del paciente sin progresión del cáncer de CSC, recidiva o a una prolongación de su supervivencia global.
- 25 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo de la invención para uso en un método para tratar metástasis o metástasis de un cáncer de CSC.
- En el contexto de la invención, el término "tratar la metástasis" abarca la prevención de metástasis de un cáncer de CSC.
- 30 En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo de la invención para prevenir la recaída o recidiva de un cáncer de CSC.
- El anticuerpo de la invención para el tratamiento del cáncer de CSC se usa para mejorar la supervivencia (más particularmente la tasa de supervivencia de 5 años) de los pacientes afectados por un cáncer de CSC.
- 35 Por lo tanto, en una realización particular, la invención se refiere a un anticuerpo de la invención para uso en un método para el tratamiento de un cáncer de CSC, siendo dicho cáncer de CSC un cáncer asociado a un mal pronóstico.
- Como se usa en esta memoria, un cáncer asociado a un mal pronóstico corresponde a un cáncer asociado con un pronóstico medio de menos de 5 años, preferiblemente menos de 2 años y aun preferiblemente menos de 1 año.
- 40 En este contexto, el anticuerpo de la invención se usa preferiblemente en combinación con al menos otro compuesto anticanceroso u otra terapia anticancerosa para el tratamiento del cáncer de CSC. Esta combinación puede potenciar los efectos de la terapia anticancerosa y disminuir el riesgo de propagación, recaída o recidiva de dicho cáncer de CSC.
- 45 Los compuestos y terapias anticancerosas son diversos y bien conocidos en la técnica. Abarcan estrategias anticancerosas convencionales y generales, tales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, pero también terapia hormonal. También comprenden terapias más específicas, incluida la terapia dirigida a una diana, incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos tumorales e inhibidores de la tirosina-quinasa y CDK, inhibidores de la angiogénesis ...
- 50 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo de la invención y al menos otro compuesto anticanceroso como una preparación combinada para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento del cáncer de CSC.
- En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo de la invención combinado con cirugía, quimioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida a una diana y/o radioterapia para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento del cáncer de CSC.
- La combinación de un anticuerpo de la invención con otro tratamiento del cáncer podría conducir a la regresión completa del tumor.

Un segundo objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método para tratar el cáncer de CSC, comprendiendo dicha composición farmacéutica un anticuerpo de la invención o uno de sus fragmentos funcionales.

Los anticuerpos de la invención se han descrito anteriormente.

5 De acuerdo con la invención, dicho anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende al menos un marco de región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO:1 para CDR-L1, SEQ ID NO:2 para CDR-L2, SEQ ID NO:3 para CDR-L3, y/o

10 b) una cadena pesada que comprende al menos un marco de región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO:4 para CDR-H1, SEQ ID NO:5 para CDR-H2, SEQ ID NO:6 para CDR-H3.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención comprende:

15 a) una cadena ligera que comprende un marco de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO:1 para CDR-L1, SEQ ID NO:2 para CDR-L2, SEQ ID NO:3 para CDR-L3, y/o

b) una cadena pesada que comprende un marco de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO:4 para CDR-H1, SEQ ID NO:5 para CDR-H2, SEQ ID NO:6 para CDR-H3.

20 En otra realización, dicha composición comprende un fragmento funcional de un anticuerpo de la invención en el que dicho fragmento se elige entre el grupo que comprende o consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Facb, Fd, scFv, diacuerpos y monocuerpos que incluyen fragmentos de VHH y fragmentos de VH humano.

De acuerdo con la invención, dicho fragmento comprende las CDR del anticuerpo de la invención y es capaz de reconocer el gangliósido GD2 O-acetilado.

25 En otra realización, dicha composición comprende un anticuerpo de la invención en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

En una realización preferida, dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:8.

30 En otra realización, dicha composición comprende un anticuerpo de la invención en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

En otra realización, el anticuerpo de la invención es un inmunoconjugado.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención es un inmunoconjugado en el que dicho inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención o uno de sus fragmentos funcionales y un agente citotóxico.

35 En otra realización particular, el anticuerpo de la invención es un inmunoconjugado en el que dicho inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención o uno de sus fragmentos funcionales y un radioisótopo.

Los cánceres de CSC de la invención también se han descrito anteriormente.

40 En una realización, la composición de la invención es para uso en un método para tratar un cáncer de CSC elegido entre el grupo que comprende o consiste en leucemia, incluyendo leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica aguda, cáncer de mama, glioma incluyendo glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de vejiga o cáncer gástrico.

En una realización preferida, dicho cáncer de CSC es glioma, cáncer de mama, leucemia linfocítica aguda o leucemia mieloide aguda.

45 En otra realización, dicho cáncer de CSC comprende células que tienen al menos un fenotipo elegido entre el grupo que comprende o consiste en: CD34⁺/CD38⁻, CD34⁺/CD19⁻, CD34⁺/CD19⁺, CD34⁺/CD38⁺/CD19⁺, CD34⁺/CD38⁻/CD19⁺, CD133⁺/CD19⁻, interleuquina-3-receptor α^+ , CD33⁺, CD44⁺/CD24^{-/bajo}, CD44⁺/CD24^{+/ESA⁺}, CD44⁺/CD24^{bajo/lin⁻/ALDH⁺}, CD133⁺, A2B5⁺, SSEA-1⁺, CD133⁺/ESA^{alto}/CD44⁺, CD166⁺, CD26⁺, CD44⁺/CD133⁺/α2β1⁺, CD44⁺, Sca⁺/CD45^{+/Pecam⁺/CD34⁺}, ALDH1⁺/Oct4^{+/CD133⁺/ABCG2^{+/CXCR4⁺}}, CD133⁺/CD44⁺, EpCAM^{+/AFP⁺}, EMA^{+/CD44v6⁺}, CD133^{+/CD44^{+/ALDH1⁺}}.

50 En una realización más particular de la invención, el cáncer de CSC de la invención comprende células CD133⁺, células CD44⁺, más particularmente células CD44^{+/CD24^{-/bajo}} o células CD34⁺, más particularmente células CD34^{+/CD38⁻} o CD34^{+/CD19⁺}, incluso más particularmente células CD34^{+/CD19^{+/CD38⁻} o CD34^{+/CD19^{+/CD38⁺}.}}

En una realización preferida de la invención, el cáncer de CSC de la invención se caracteriza por una subpoblación de células madre cancerosas en la que al menos el 10% de las células madre cancerosas expresan el gangliósido GD2 O-acetilado, preferiblemente al menos el 30% de las células madre cancerosas, y más preferiblemente al menos el 50% de las células madre expresan el gangliósido GD2 O-acetilado.

- 5 En una realización particular de la invención, dicho cáncer de CSC es cáncer de mama. En una realización más particular, dicho cáncer de CSC es cáncer de mama en el que las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD44⁺/CD24^{-/bajo}.

En otra realización particular de la invención, dicho cáncer de CSC es glioma. En una realización más particular, dicho cáncer de CSC es glioma en el que las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD133⁺.

- 10 En otra realización particular de la invención, dicho cáncer de CSC es leucemia en donde las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD34⁺, más particularmente dicho cáncer de CSC es leucemia mieloide aguda en donde las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD34⁺/CD38⁻ o leucemia linfocítica aguda en donde las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD34⁺/CD19⁺, preferiblemente un fenotipo CD34⁺/CD19⁺/CD38⁻ o CD34⁺/CD19⁺/CD38⁺.

- 15 En una realización, la invención se refiere a una composición de la invención para uso en un método para tratar metástasis o metástasis de un cáncer de CSC.

En otra realización, la invención se refiere a una composición de la invención para uso en un método para prevenir la recaída o la recidiva de un cáncer de CSC.

- 20 Por tanto, en una realización particular, la invención se refiere a una composición de la invención para el tratamiento de un cáncer de CSC, en el que dicho cáncer de CSC es un cáncer asociado a un mal pronóstico.

En una realización, la invención se refiere a una composición de la invención y al menos a otro compuesto anticancerígeno como una preparación combinada para uso separado, simultáneo o secuencial en un método para el tratamiento del cáncer de CSC.

- 25 En otra realización, la invención se refiere a una composición de la invención combinada con cirugía, quimioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida a una diana y/o radioterapia para uso separado, simultáneo o secuencial en un método para el tratamiento de cáncer de CSC.

La composición farmacéutica de la invención comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 30 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente reacciones alérgicas o indeseables similares, tales como malestar gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, como se usa en la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa autorizable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerada en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

- 35 El término "vehículo" se refiere a un disolvente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

- 40 La vía de administración de la composición de la invención es preferiblemente parenteral; como se usa en la presente memoria, el término "parenteral" incluye administración intratumoral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. Por tanto, la composición farmacéutica contiene vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación destinada a ser inyectada. Estos pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas y estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que, por adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados están descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. De estas, la más preferida es la administración intravenosa o intratumoral.

- 45 El anticuerpo se puede solubilizar en un tampón o agua o incorporarse en emulsiones, microemulsiones, hidrogeles (por ejemplo, hidrogeles a base de copolímeros de tribloques de PLGA-PEG-PLGA), en microesferas, en nanoesferas, en micropartículas, en nanopartículas (por ejemplo, poli(ácido láctico-co-glicólico), micropartículas (por ejemplo, poli(ácido láctico) (PLA); poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA)); microesferas, nanoesferas, micropartículas o nanopartículas de poliglutamato), en liposomas u otras formulaciones galénicas. En todos los casos, la formulación debe ser estéril y fluida hasta el grado de una jeringabilidad aceptable. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

- 55 Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, sus mezclas y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el desarrollo de microorganismos.

El anticuerpo se puede formular en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de las proteínas) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden proceder de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), sus mezclas adecuadas y aceites vegetales. Los conjugados de la invención también se pueden modificar, por pegilación como ejemplo, para aumentar su biodisponibilidad.

La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr por el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina, polioles, formulaciones covalentes y no covalentes que mejoran la semivida.

Existen numerosas causas de inestabilidad o degradación de péptidos, incluyendo la hidrólisis y la desnaturalización. La interacción hidrófoba puede causar el aglutinamiento de moléculas (es decir, agregación). Se pueden añadir estabilizadores para reducir o prevenir dichos problemas.

Los estabilizadores incluyen ciclodextrina y sus derivados (véase la Patente de EE.UU. N° 5.730.969). También se pueden añadir conservantes adecuados, tales como sacarosa, manitol, sorbitol, trehalosa, dextrano y glicerina para estabilizar la formulación final. Se puede añadir a la formulación un estabilizador seleccionado de tensioactivos iónicos y no iónicos, D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, ácido D-galacturónico, trehalosa, dextranos, hidroxietilalmidones y sus mezclas. La adición de sal de metal alcalino o cloruro de magnesio puede estabilizar un péptido. El péptido también se puede estabilizar poniéndolo en contacto con un sacárido seleccionado del grupo que consiste en dextrano, ácido condroitinsulfúrico, almidón, glicógeno, dextrina y sal de ácido algínico. Otros azúcares que se pueden añadir incluyen monosacáridos, disacáridos, azúcar-alcoholes y sus mezclas (por ejemplo, glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa, manitol, xilitol). Los polioles pueden estabilizar un péptido y son miscibles en agua o solubles en agua. Los polioles adecuados pueden ser alcoholes polihidroxilados, monosacáridos y disacáridos incluyendo manitol, glicol, etilenglicol, propilenglicol, trimetilglicol, vinilpirrolidona, glucosa, fructosa, arabinosa, manosa, maltosa, sacarosa y sus polímeros. Varios excipientes también pueden estabilizar péptidos, incluyendo albúmina sérica, aminoácidos, heparina, ácidos grasos y fosfolípidos, tensioactivos, metales, polioles, agentes reductores, agentes quelantes de metales, polivinilpirrolidona, gelatina hidrolizada y sulfato de amonio.

En una realización de la invención, la composición farmacéutica de la invención comprende además un compuesto activo adicional en forma de dosificación separada o unitaria para uso o administración separado, simultáneo o secuencial.

Un tercer objeto de la invención se refiere a un método para tratar un cáncer de CSC en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo o una composición de la invención.

Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino o un primate, y lo más preferiblemente un ser humano.

Las composiciones y los anticuerpos de la invención se han descrito con detalle anteriormente.

En una realización, la invención se refiere a dicho método para tratar un cáncer de CSC elegido entre el grupo que comprende o consiste en leucemia incluyendo leucemia mieloide aguda y leucemia linfoide aguda, cáncer de mama, glioma incluyendo glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de vejiga o cáncer gástrico.

En una realización preferida, dicho cáncer de CSC es glioma, cáncer de mama, leucemia linfoide aguda o leucemia mieloide aguda.

En otra realización, dicho cáncer de CSC comprende células que tienen al menos un fenotipo elegido entre el grupo que comprende o consiste en: CD34⁺/CD38⁻, CD34⁺/CD19⁻, CD34⁺/CD19⁺, CD34⁺/CD38⁺/CD19⁺, CD34⁺/CD38⁻/CD19⁺, CD133⁺/CD38⁻; CD133⁺/CD19⁻; interleuquina-3-receptor α^+ , CD33⁺, CD44⁺/CD24^{-bajo}, CD44⁺/CD24⁻/ESA⁺, CD44⁺/CD24^{bajo}/lin⁻/ALDH⁺, CD133⁺, A2B5⁺, SSEA-1⁺, CD133⁺/ESA^{alto}/CD44⁺, CD166⁺, CD26⁺, CD44⁺/CD133⁺ α 2 β 1⁺, CD44⁺, Sca⁺/CD45⁺/Pecam⁺/CD34⁺, ALDH1⁺/Oct4⁺/CD133⁺/ABCG2⁺/CXCR4⁺, CD133⁺/CD44⁺, EpCAM⁺/AFP⁺, EMA⁺/CD44v6⁺, CD133⁺/CD44⁺/ALDH1⁺.

En una realización más particular de la invención, el cáncer de CSC de la invención comprende células CD133⁺, células CD44⁺, más particularmente células CD44⁺/CD24^{-bajo} o células CD34⁺, más particularmente células CD34⁺/CD38⁻ o CD34⁺/CD19⁺, incluso más particularmente células CD34⁺/CD19⁺/CD38⁻ o CD34⁺/CD19⁺/CD38⁺.

5 En una realización preferida de la invención, el cáncer de CSC de la invención se caracteriza por una subpoblación de células madre cancerosas en la que al menos el 10% de las células madre cancerosas presentan el gangliósido GD2 O-acetilado en su superficie, preferiblemente al menos el 30% de las células madre cancerosas, y más preferiblemente al menos el 50% de las células madre presentan el gangliósido GD2 O-acetilado en su superficie.

10 En una realización particular de la invención, dicho cáncer de CSC es cáncer de mama. En una realización más particular, dicho cáncer de CSC es cáncer de mama en el que las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD44⁺/CD24^{-bajo}.

En otra realización particular de la invención, dicho cáncer de CSC es glioma. En una realización más particular, dicho cáncer de CSC es glioma en el que las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD133⁺.

15 En otra realización particular de la invención, dicho cáncer de CSC es leucemia en donde las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD34⁺, más particularmente dicho cáncer de CSC es leucemia mieloide aguda en donde las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD34⁺/CD38⁻ o leucemia linfocítica aguda en la que las células madre cancerosas se caracterizan por un fenotipo CD34⁺/CD19⁺, preferiblemente un fenotipo CD34⁺/CD19⁺/CD38⁻ o CD34⁺/CD19⁺/CD38⁺.

En una realización, la invención se refiere a dicho método para tratar metástasis o metástasis de un cáncer de CSC.

En otra realización, la invención se refiere a dicho método para prevenir la recaída o recidiva de un cáncer de CSC.

20 En una realización particular, la invención se refiere a un método para tratar un cáncer de CSC de la invención, en donde dicho cáncer de CSC es un cáncer asociado a un mal pronóstico.

25 En una realización, la invención se refiere a un método para tratar un cáncer de CSC en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo o una composición de la invención y al menos otro compuesto anticanceroso como una preparación combinada para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento del cáncer de CSC.

En otra realización, la invención se refiere a un método para tratar el cáncer de CSC de la invención combinado con cirugía, quimioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida a una diana y/o radioterapia para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento del cáncer de CSC.

30 Una "cantidad eficaz" de la composición es una cantidad que es suficiente para inducir la regresión del crecimiento del tumor. Las dosis utilizadas para la administración se pueden adaptar en función de diversos parámetros, en particular en función del modo de administración utilizado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento. Naturalmente, la forma de la composición farmacéutica, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del sujeto, etc. Los intervalos de dosis eficaces proporcionadas a continuación no pretenden limitar la invención y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosis preferida se puede adaptar al sujeto individual, como entiende y puede determinar un experto en la técnica, sin experimentación excesiva.

40 Como ilustración, una cantidad eficaz de al menos un conjugado es desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 1.000 mg/m², más preferiblemente desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 750 mg/m², y lo más preferiblemente desde aproximadamente 250 hasta aproximadamente 500 mg/m². Son viables otras dosificaciones, ya que el peso molecular del conjugado del mismo puede influenciar en ella. El experto en la técnica decidirá fácilmente una dosificación adecuada que se encuentre dentro de los intervalos, o si es necesario, fuera de los intervalos.

Estrategias diagnósticas de la invención

45 Un cuarto objeto de la invención se refiere a un método para diagnosticar un cáncer de CSC en un sujeto, en donde dicho método comprende determinar la expresión del gangliósido GD2 O-acetilado y en donde una expresión del gangliósido GD2 O-acetilado es indicativo de un cáncer de CSC.

La invención abarca métodos *in vivo* e *in vitro*.

50 En una realización, la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar un cáncer de CSC en un sujeto, en donde dicho método comprende la etapa de analizar una muestra biológica obtenida de dicho sujeto (i) determinando la expresión del gangliósido GD2 O-acetilado, y en donde una expresión del gangliósido GD2 O-acetilado en dicha muestra biológica es indicativa de un cáncer de CSC.

55 Ventajosamente, la etapa de determinación (i) es evaluada por un anticuerpo o su fragmento funcional como se ha descrito previamente. Dicho anticuerpo o su fragmento puede estar marcado (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con un cromóforo, marcado con un fluoróforo o marcado con enzima) o ser un derivado (por

ejemplo, un conjugado de anticuerpo con un sustrato o con la proteína o ligando de una proteína de una pareja proteína/ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina)).

Dicho análisis se puede evaluar por una variedad de métodos muy conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, aunque sin limitación, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de transferencia de Western y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunocromatografía en capa fina (ITLC), técnicas de obtención de imágenes, en particular técnica de tomografía por emisión de positrones (PET-Scan).

Los métodos *in vivo* de la invención se evalúan por un anticuerpo de la invención o su fragmento funcional, que es adecuado para una administración *in vivo*. Preferiblemente, dichos métodos *in vivo* se evalúan por métodos de obtención de imágenes *in vivo*, tales como el método PET-Scan. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, el término "muestra biológica" significa cualquier muestra biológica procedente de un paciente, preferiblemente dicha muestra biológica se refiere a una biopsia que se ha extraído del cuerpo de un sujeto antes de ejecutar el método de la invención.

En una realización, dicho cáncer de CSC se elige entre el grupo que comprende o consiste en leucemia incluyendo leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica aguda, cáncer de mama, glioma incluyendo glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de vejiga o cáncer gástrico.

En una realización preferida, dicho cáncer de CSC es un glioma, un cáncer de mama, una leucemia linfocítica aguda o una leucemia mieloide aguda.

Un quinto objeto de la invención se refiere al uso del gangliósido GD2 O-acetilado como un biomarcador del cáncer de CSC.

El término "gangliósido GD2 O-acetilado" se refiere a un gangliósido derivado del gangliósido GD2 y que corresponde a 9(7)-O-acetil-GD2.

Un sexto objeto de la invención se refiere a un método para predecir la respuesta de un sujeto afectado de cáncer de CSC a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de la invención, en donde dicho método comprende detectar la presencia de células que expresan el gangliósido GD2 O-acetilado en una muestra biológica de dicho sujeto.

En una realización, la invención se refiere a dicho método para predecir la respuesta de un sujeto afectado de cáncer de CSC a un tratamiento con un anticuerpo o una composición de la invención, en donde la presencia de células que expresan el gangliósido GD2 O-acetilado en una muestra biológica de dicho sujeto se correlaciona con una buena probabilidad de que dicho sujeto responda a dicho tratamiento.

En una realización más particular, la invención se refiere a dicho método que comprende detectar el nivel de células madre cancerosas que expresan el gangliósido GD2 O-acetilado entre todas las células madre cancerosas en una muestra biológica de dicho sujeto.

En una realización preferida, un nivel de al menos el 10%, particularmente al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50% de las células madre cancerosas que presentan el gangliósido GD2 O-acetilado en su superficie entre todas las células madre cancerosas en una muestra biológica de dicho sujeto se correlaciona con una alta probabilidad de que dicho sujeto responda a dicho tratamiento.

En una realización, dicha muestra biológica es una muestra de cáncer, preferiblemente una muestra de cáncer de CSC.

En una realización, dicho cáncer de CSC se elige entre el grupo que comprende o consiste en leucemia incluyendo leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica aguda, cáncer de mama, glioma incluyendo glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de vejiga o cáncer gástrico.

En una realización preferida, dicho cáncer de CSC es un glioma, un cáncer de mama, una leucemia linfocítica aguda o una leucemia mieloide aguda.

En una realización de la invención, dicho método comprende detectar la presencia de células que expresan el gangliósido GD2 O-acetilado en pacientes por métodos no invasivos como la obtención de imágenes utilizando un agente de obtención de imágenes *in vivo*. Dichos métodos son muy conocidos en la técnica.

Ejemplos

A continuación, la invención se describe con más detalle con referencia a secuencias de aminoácidos, secuencias de ácidos nucleicos y ejemplos. Sin embargo, no se pretende ninguna limitación de la invención por los detalles de los ejemplos. Más bien, la invención se refiere a cualquier realización que comprenda detalles que no se mencionan explícitamente en los ejemplos de dicha invención, pero que los expertos encuentran sin esfuerzo excesivo.

• Gliomas

Evaluación de la expresión del gangliósido OAcGD2 en glioma

◦ Expresión de OAcGD2 en biopsias de glioblastomas

5 Los inventores evaluaron la expresión del gangliósido GD2 O-acetilado (OAcGD2) en 22 muestras de glioblastoma utilizando inmunohistoquímica (IHC). Un ejemplo de tinción inmunohistoquímica para diagnóstico se muestra en la Figura 1, donde los tejidos están teñidos para el antígeno OAcGD2.

10 Las muestras de tumores (glioblastomas) se obtuvieron por escisión quirúrgica. Se retiró una muestra de tejido (volumen $\leq 0,5 \text{ cm}^3$) y se congeló en isopentano enfriado hasta la temperatura del nitrógeno líquido. Después de 60 segundos, la muestra se retiró y se transfirió y se mantuvo a -70°C . Se realizaron cortes de $10 \mu\text{m}$ utilizando un criostato. Los cortes se recogieron en portaobjetos de vidrio SUPERFROST GOLD + (VWR) y se secaron al aire durante 3 minutos. Luego se fijaron en acetona (-20°C) durante 10 minutos y se secaron al aire nuevamente. Los cortes se almacenaron luego a -20°C hasta su uso.

15 La inmunorreactividad del anticuerpo 8B6 se detectó por incubación en etapas con un anticuerpo anti-ratón de cabra biotinilado, seguido de complejo de estreptavidina-biotina-peroxidasa y sustrato DAB. La muestra fue analizada por un patólogo con un equipo de microscopía óptica y clasificada como negativa, 1+, 2+ o 3+, en comparación con un corte congelado de neuroblastoma humano como control positivo y tejido incubado con un anticuerpo IgG3 irrelevante como control negativo. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Número de muestra	Puntuación	% de células tumorales OAcGD2+
5	1+	ND
14	2+	100
3	3+	100

20 (ND: No determinado)

Encontraron que todas las muestras se tiñeron positivamente con el anticuerpo monoclonal anti-OAcGD2 (mAb) 8B6, con una puntuación de IHC que varía de 1+ a 3+. En 16 muestras entre 22, 100% de las células tumorales fueron positivas dentro del tumor.

◦ Expresión de OAcGD2 en líneas celulares de glioma y células primarias

25 Los perfiles de expresión de CD133 y OAcGD2 en células de glioblastoma humano U87MG se determinaron por análisis de citometría de flujo. Las células se tiñeron con el mAb 8B6 de ratón precursor específico para OAcGD2 y con el anticuerpo CD133-FITC. Las células se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo, se incubaron con mAb 8B6 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS-BSA al 1%) durante 30 minutos a 4°C . Después de 3 lavados con PBS enfriado con hielo, el anticuerpo primario unido se detectó con el fragmento $\text{F(ab)}'_2$ del anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con FITC durante 30 minutos. Después del lavado, las células se incubaron con el anticuerpo conjugado CD133-APC durante 30 minutos a 4°C . Después de lavar las células 3 veces con PBS enfriado con hielo, las células se analizaron con un citómetro FACSCalibur (BD) utilizando el programa informático Cell Quest Pro (BD). Se usó un anticuerpo del mismo isotipo como control negativo. Se midieron al menos 1×10^4 episodios en líneas celulares.

35 Usando la citometría de flujo, los inventores también detectaron el antígeno OAcGD2 en la superficie celular de líneas de células de glioma humano (3/3) y células de glioma primario humano (12/12). Para las líneas de células de glioma humano, la tasa de células positivas al OAcGD2 variaba de 61 a 85% (Figura 2, Tabla 3).

También observaron la presencia de $\text{CD133}^+\text{OAcGD2}^+$ CSC en estas líneas de células de glioma, y dentro de las células positivas a CD133, la tasa de células positivas a OAcGD2 fue aproximadamente 85 a 98%.

40 Para las células de glioma primario humano, la tasa de células positivas a OAcGD2 variaba entre 32 y 94%. También observaron la presencia de $\text{CD133}^+\text{OAcGD2}^+$ CSC en estas células de glioma primario, y dentro de las células positivas a CD133, la tasa de células positivas a OAcGD2 fue aproximadamente 62 a 100% (Tabla 3).

Tabla 3. Poblaciones de OAcGD2^+ , CD133^+ y $\text{OAcGD2}^+\text{CD133}^+$ (porcentaje de células de OAcGD2^+ entre CD133^+) en células de glioma

Citometría de flujo	Nombre	% de población: OAc-GD2 ⁺	% de población: CD133 ⁺	% de población ⁺⁺ : (OAc-GD2 ⁺ CD133 ⁺)/pob. tot. CD133 ⁺ x 100	% de OAcGD2 en pob. CD133 ⁺
Células primarias	AMBMa	75 %	15,4 %	96,2 %	71,2 %
	BROJa	68 %	50,55 %	91,4 %	44,1 %
	CoxCa	55,55 %	27,4 %	91,8 %	41,9 %
	DONGu	40,2 %	14,1 %	71,1 %	35,2 %
	DuGan	59,9 %	34,8 %	94,4 %	41,5 %
	HouHe	29,2 %	28,4 %	61,7 %	16,3 %
	BauJe	94,6 %	18,55 %	99,8 %	93,4 %
	BICyv	84,05 %	8,2 %	97,8 %	82,8 %
	CauMi	79,15 %	5,05 %	100 %	78 %
	DuASO	88,8 %	11,9 %	100 %	87,3 %
	GBMA1	54 %	7,9 %	90,9 %	50,8 %
Líneas celulares	HARci	69,9 %	6,2 %	99,7 %	67,9 %
	LN-18	84,1 %	11 %	94,1 %	82,9 %
	U251	46,5 %	1,4 %	84,9 %	46 %
	U87-MG	81,3 %	14,9 %	98,3 %	78,4 %

Los resultados confirman los obtenidos en las biopsias de glioblastomas con una fuerte expresión de OAcGD2 en células primarias de glioma y también en líneas de células de glioma. Además, la búsqueda de CSC (CD133⁺) entre estas células primarias de glioma y también las líneas de células de glioma ha permitido la identificación de varios porcentajes de dichas CSC (CD133⁺). Ahora, y sorprendentemente, los resultados han demostrado que la expresión de OAcGD2 está enriquecida en estas CSC en comparación con no CSC. Como ejemplo, el porcentaje de células positivas a OAcGD2 fue el doble para CSC que para no CSC (datos no mostrados).

Finalmente, los resultados establecieron que OAcGD2 está enriquecido en CSC de gliomas y se puede usar para facilitar el uso como diana de estas células.

Efectos de mAb 8B6 sobre células de glioma que expresan OAcGD2.

Se sembraron células tumorales U87-MG (5×10^5 células) en placas de 12 pocillos de fondo plano y se incubaron con mAb 8B6 o anticuerpo IgG3 de control durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂. Se obtuvieron imágenes de los cultivos celulares con una cámara digital LEICA DFC295 acoplada a un microscopio LEICA 164.

Después de un período de incubación de 24 horas, se observaron células apoptóticas evaluadas por cambios morfológicos bajo un microscopio de contraste de fases con el mismo aumento, 200. La flecha indica la célula apoptótica.

El tratamiento con mAb 8B6 indujo cambios en la morfología de las células U87MG. Las células incubadas con mAb 8B6 tenían una forma esférica y formaron ampollas, que se unieron holgadamente al fondo del recipiente de cultivo o flotaron en los medios de cultivo. Las células segregadas en varios fragmentos son características de la apoptosis (Figura 3). Entre las células U87-MG, se puede especular que las CSC, cuyas células expresaron el mayor porcentaje de OAcGD2, mueren después de la apoptosis.

Efectos del mAb 8B6 sobre el glioblastoma en un modelo *in vivo*

Ratones atímicos (nu/nu) hembras (Harlan Laboratories) fueron cuidados y mantenidos de acuerdo con las normas de *European Animal Welfare* en virtud de un protocolo institucional aprobado de cuidado y uso de animales en una instalación para animales de la Universidad de Nantes acreditada por el Ministerio francés de Agricultura.

Partes alícuotas de suspensión de células U251 (3×10^6 células/100 μ L que contenían un volumen igual de RPMI y matrigel) se implantaron por vía subcutánea en el costado izquierdo de los ratones. Una semana más tarde, la masa tumoral estaba presente en todos los ratones originalmente inyectados que luego se aleatorizaron en tres grupos iguales y se inició el tratamiento con anticuerpo. El mAb 8B6 anti-OAcGD2 se formuló como una solución salina tamponada con fosfato y se inyectó por vía intravenosa. Un grupo se trató con una inyección de 500 μ g de mAb 8B6 mientras que el grupo de control se trató con un volumen igual de PBS solo como vehículo. El tercer grupo se trató con un mAb del mismo de isotipo como control negativo. Los tumores se midieron con calibradores; el volumen del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula: longitud x anchura² x $\pi/6$.

Los inventores encontraron también que el mAb anti-OAcGD2 inhibe el desarrollo de tumores de glioblastoma humano en ratones (Figura 4). Cuando el volumen del tumor alcanzó 100 mm³, a los ratones se les inyectaron bien 500 μ g de mAb 8B6 o mAb IgG3 de control y se siguió el desarrollo del tumor. El anticuerpo 8B6 inhibió el desarrollo del tumor de glioblastoma U251 humano en comparación con los ratones tratados con IgG3 de control y con

vehículo. Sesenta y ocho días después de la inyección del anticuerpo, los volúmenes tumorales presentaban un volumen medio de $423 \pm 236 \text{ mm}^3$ y $405 \pm 176 \text{ mm}^3$ en los grupos tratados con vehículo y con IgG3 de control, respectivamente. En contraste, el tratamiento con mAb 8B6 inhibió el desarrollo del tumor U251 con un volumen tumoral medio de $254 \pm 142 \text{ mm}^3$. Se demostró la especificidad del tratamiento ya que el tratamiento con una cantidad equivalente de anticuerpo IgG3 no específico seguía siendo ineficaz. Finalmente, se demostró que se pueden identificar células que no son CSC en ratones tratados con 8B6 en comparación con ratones tratados con IgG3 (datos no mostrados).

En conclusión, los resultados establecieron que el anticuerpo anti-OAcGD2 ha permitido eliminar las células CSC *in vivo*, estando asociada esta eliminación con una inhibición clara y fuerte del desarrollo tumoral.

10 • Cánceres de mama

Evaluación de la expresión del gangliósido OAcGD2 en cáncer de mama

◦ Expresión del OAcGD2 en tejidos de cáncer de mama

Los inventores han realizado una inmunohistoquímica preliminar para evaluar la expresión de OAc-GD2 en tejidos de cáncer incrustados en parafina y formados con formalina con el anticuerpo monoclonal 8B6.

15 Entonces, establecieron que, entre 25 biopsias de cáncer de mama teñidas, 18 muestras se tiñeron positivamente, presentando 1 muestra una tinción débil (puntuación 1+), presentando 9 muestras una tinción moderada (puntuación 2+) y presentando 8 muestras una tinción fuerte (puntuación 3+).

Esta fuerte correlación entre el tejido de cáncer de mama y el OAcGD2 fue confirmada por otros ensayos inmunoquímicos realizados en 28 cortes congelados de otros tejidos de cáncer de mama. Para esta serie de experimentación, todas las muestras se tiñeron positivamente para OAcGD2.

En consecuencia, parece que OAcGD2 puede ser usado como un marcador para el cáncer de mama.

◦ Expresión del OAcGD2 en líneas de células de cáncer de mama

La expresión del OAcGD2 se ha evaluado en la línea de células de cáncer de mama SUM159. El perfil de expresión de OAcGD2 en células madre cancerosas de mama humanas se determinó por análisis de citometría de flujo después de una tinción triple con fluorescente. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios 8B6, 14G2a y 7H2 (a $10 \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 45 minutos en hielo en PBS-BSA al 1%. Después de 3 lavados con PBS enfriado con hielo, se detectó anticuerpo primario unido con IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor® 568 (H+L) (Life Technologies) durante 45 minutos en hielo. A continuación, las células se fijaron a PFA al 4% durante 10 minutos y luego se incubaron durante 25 minutos con conjugado anti-CD24 con FITC y conjugado anti-CD44 con APC (BD). Después de lavado, las células se analizaron con un citómetro de flujo LSRII (BD) utilizando el programa informático FlowJo (BD). Se midieron al menos 1×10^4 episodios en las líneas celulares.

Se encontró que aproximadamente 35% de las células expresaba OAcGD2 (anticuerpo 8B6), mientras que solo cerca del 15% expresaba el gangliósido GD2 (anticuerpo 14G2a). Se confirmó dicha expresión diferente en otras líneas de células de cáncer de mama (HMLE, datos no mostrados). Luego, se evaluó la proporción de células CD44⁺CD24^{-bajo} dentro de la línea celular SUM159 y se demostró que el 94% de las células presentaba un fenotipo de CSC. Si el porcentaje de células positivas a OAcGD2 entre las CSC en comparación con las no CSC no se determinó en SUM159, se demostró que dicho porcentaje era 5 veces mayor en otras líneas de células de cáncer de mama (HMLE, datos no mostrados). Por tanto, y como para los resultados obtenidos en gliomas, parece que OAcGD2 está enriquecido en las CSC de los cánceres de mama y se puede usar para facilitar el uso como diana de estas células. Además, estos resultados son muy interesantes puesto que permiten considerar la eficacia terapéutica de un tratamiento dirigido a OAcGD2 en contraste con un tratamiento dirigido a GD2. De hecho, usar como diana el pequeño porcentaje de células que expresan GD2 no garantiza limitar la propagación del cáncer asociado.

Inhibición de la viabilidad de las células de cáncer de mama con el anticuerpo 8B6

Los inventores realizaron un ensayo de proliferación celular con anticuerpos anti-OAcGD2 y anti-GD2 de la línea celular SUM159 de cáncer de mama.

Se incubaron 10^4 células SUM159 ($100 \mu\text{L}$) en una microplaca de 96 pocillos 24 horas a 37°C . Se añadieron anticuerpos de $80\text{-}1,25 \mu\text{g}/\text{mL}$ en $50 \mu\text{L}$ de medio y se incubaron 24 horas a 37°C . A cada pocillo se añadieron $50 \mu\text{g}$ de MTT y se incubaron al menos 4 horas a 37°C , antes se solubilizaron las células con SDS al 10% para detener la conversión celular del colorante MTT y se incubaron O.N. a 37°C . Luego se leyó la absorbancia a 570 y 650 nm. La absorbancia del producto a 650 nm se restó de la absorbancia a 570 nm ($\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{650}$) para calcular la conversión total del colorante. Cuatro pocillos de control con células tratadas con $20 \mu\text{g}$ de etopósido proporcionan el blanco para la absorbancia dando el 0% de viabilidad. La viabilidad (%) se expresó como un porcentaje con relación a las células no tratadas y cada valor se representa por cuadruplicado como media \pm SEM.

El anticuerpo 8B6 indujo una citotoxicidad directa en esta línea celular que se aproxima al 30% de inhibición de la viabilidad (Figura 5).

• **Cánceres de pulmón**

Evaluación de la expresión del gangliósido OAcGD2 en cáncer de pulmón de células pequeñas

◦ Expresión de OAcGD2 en líneas de células de cáncer de pulmón

5 La expresión de OAcGD2 se evaluó en la línea de células de cáncer de pulmón H196. El perfil de expresión de OAcGD2 en células madre de cáncer de pulmón humanas se determinó por análisis de citometría de flujo después de una doble tinción fluorescente. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios 8B6, 10B8 y 7H2 (a 10 µg/mL) durante 45 minutos en hielo en PBS-BSA al 1%. Después de 3 lavados con PBS enfriado con hielo, el anticuerpo primario unido se detectó con IgG anti-ratón de cabra conjugado con FITC (H+L) (JacksonResearch) durante 45 minutos en hielo. A continuación, las células se fijaron a PFA al 4% durante 10 minutos y luego se incubaron durante 25 minutos con un conjugado anti-CD133 con APC (Miltenyi Biotec). Después de lavado, las células se analizaron con un citómetro de flujo FACScalibur (BD) utilizando el programa informático CellQuest (BD). Se midieron al menos 1×10^4 episodios en las líneas celulares.

Los resultados se presentan en la figura 6.

15 De nuevo, los resultados muestran que las expresiones de OAcGD2 y de CD133 estaban correlacionadas con más del 50% de las células CSC que expresan OAcGD2. La expresión de GD2 en estas células fue ligeramente mayor que el control negativo (es decir, 7%).

De nuevo, parece que OAcGD2 está enriquecido en las CSC de cánceres de pulmón de células pequeñas y se puede usar para facilitar el uso como diana de estas células.

• **Leucemias**

20 Los inventores han realizado un ensayo preliminar de inmunofluorescencia indirecta para evaluar la expresión de OAc-GD2 en la leucemia linfocítica aguda (LLA) y la leucemia mieloide aguda (LMA) con el anticuerpo monoclonal 8B6.

Dos de las líneas celulares de LLA analizadas fueron positivas. Una muestra de LMA de un paciente también fue positiva.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Atlab Pharma
 universite de Nantes
 Terme, Mickael
 COCHONNEAU, Denis
 Birklé, Stéphane
 Dorvillius, Mylène
 Jean-Marc, Le Doussal
- 10 <120> Uso como diana del gangliosido GD2 O-acetilado como una nueva estrategia terapéutica y de diagnóstico para cáncer de células madre cancerosas
- 15 <130> ATL-B-0001-PCT1
 <150> EP13002268.4
 <151> 19-04-2013
- 20 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- 30 <400> 1
 Gln Ser Leu Leu Lys Asn Asn Gly Asn Thr Phe Leu
 1 5 10
- 35 <210> 2
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- 40 <400> 2
 Lys Val Ser
 1
- 45 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- 50 <400> 3
 Ser Gln Ser Thr His Ile Pro Tyr Thr
 1 5
- 55 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- 60 <400> 4
 Glu Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
 1 5
- <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 728 305 T3

<400> 5
 Ile Arg Asn Arg Ala Asn Gly Tyr Thr Thr
 1 5 10

5 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6
 Ala Arg Val Ser Asn Trp Ala Phe Asp Tyr
 10 1 5 10

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

<400> 7
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Lys Asn
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

20 <210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 8
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Glu Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

ES 2 728 305 T3

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Pro Pro Arg Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Arg Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Asn Pro
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Ser Asn Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena de anticuerpo químérico

<400> 9
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Lys Asn
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cadena de anticuerpo químérico

<400> 10

ES 2 728 305 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer de mama que comprende células madre cancerosas que tienen al menos un fenotipo elegido entre el grupo que comprende o consiste en CD44⁺/CD24^{-bajo}, CD44⁺/CD24^{-bajo}/ESA⁺ o CD44⁺/CD24^{-bajo}/lin⁻/ALDH1⁺, comprendiendo dicha composición farmacéutica un anticuerpo que reconoce el gangliósido GD2 O-acetilado o uno de sus fragmentos funcionales, y en la que dicho anticuerpo comprende:
- 5 a) una cadena ligera que comprende al menos un marco de región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2, SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, y/o
- 10 b) una cadena pesada que comprende al menos un marco de región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2, SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.
2. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer de mama según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un fragmento funcional de un anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho fragmento se elige entre el grupo que comprende o consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Facb, scFv, diacuerpos que incluyen fragmentos del VHH y fragmentos de VH humano.
- 15 3. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer de mama según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
4. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer de mama según la reivindicación 1 o 3, en donde dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.
- 20 5. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer de mama según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho cáncer de mama se caracteriza por una subpoblación de células madre cancerosas en la que al menos el 10% de las células madre cancerosas expresan el gangliósido GD2 O-acetilado.
- 25 6. Una preparación combinada que comprende el anticuerpo que reconoce el gangliósido GD2 O-acetilado, o uno de sus fragmentos funcionales, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y al menos otro compuesto anticanceroso para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de cáncer de mama.
7. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer de mama según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se combina con cirugía, quimioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida a una diana y/o radioterapia para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de cáncer de mama.
- 30 8. Un método *in vitro* para diagnosticar un cáncer de mama que comprende células madre cancerosas que tienen al menos un fenotipo elegido entre el grupo que comprende o consiste en CD44⁺/CD24^{-bajo}, CD44⁺/CD24^{-bajo}/ESA⁺ o CD44⁺/CD24^{-bajo}/lin⁻/ALDH1⁺ en un sujeto, en donde dicho método comprende la etapa de analizar una muestra biológica obtenida de dicho sujeto (i) determinando la expresión del gangliósido GD2 O-acetilado usando un anticuerpo que reconoce el gangliósido GD2 O-acetilado, o uno de sus fragmentos funcionales, en el que dicho anticuerpo comprende:
- 35 a) una cadena ligera que comprende al menos un marco de región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2, SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, y/o
- 40 b) una cadena pesada que comprende al menos un marco de región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2, SEQ ID NO: 6 para CDR-H3,
- 45 y en donde una expresión del gangliósido GD2 O-acetilado en dicha muestra biológica es indicativa de un cáncer de mama.
9. Uso de un anticuerpo que reconoce el gangliósido GD2 O-acetilado o uno de sus fragmentos funcionales, en donde dicho anticuerpo comprende:
- 50 c) una cadena ligera que comprende al menos un marco de región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2, SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, y / o
- d) una cadena pesada que comprende al menos un marco de región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina y tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) definidas por las secuencias SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2, SEQ ID NO: 6 para CDR-H3,

para detectar el gangliósido GD2 O-acetilado como un biomarcador de cáncer de mama que comprende células madre cancerosas que tienen al menos un fenotipo elegido entre el grupo que comprende CD44⁺/CD24^{-bajo}, CD44⁺/CD24^{-bajo}/ESA⁺ o CD44⁺/CD24^{-bajo}/lin⁻/ALDH1⁺.

- 5 10. Un método para predecir la respuesta de un sujeto afectado con cáncer de mama a un tratamiento con un anticuerpo que reconoce el gangliósido GD2 O-acetilado, o uno de sus fragmentos funcionales, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho método comprende detectar la presencia de células madre cancerosas que expresan el gangliósido GD2 O-acetilado en una muestra biológica de dicho sujeto.

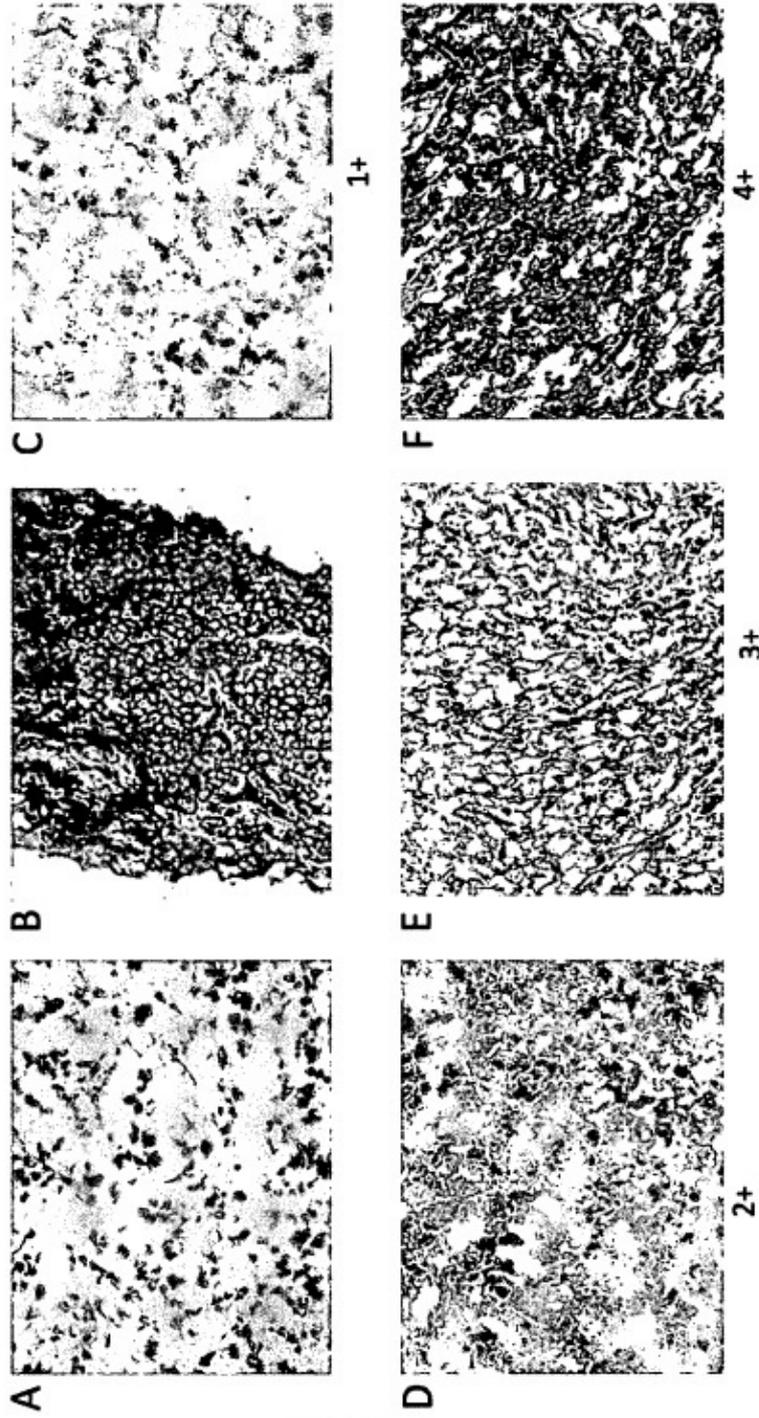


Figura 1

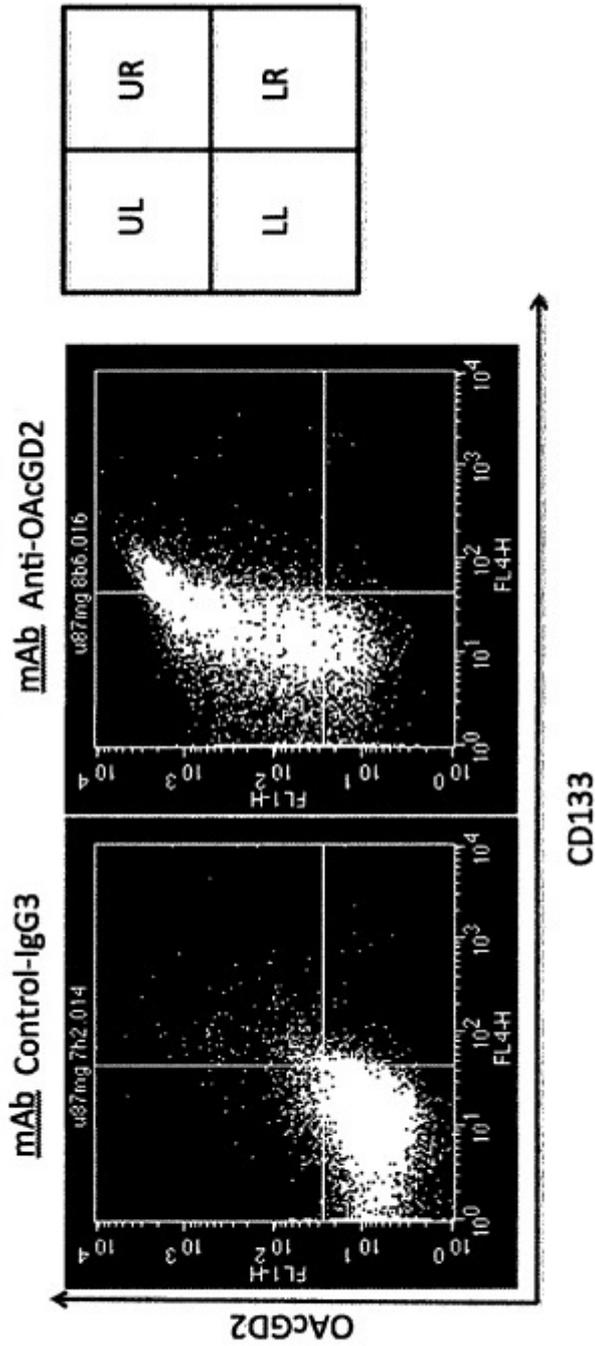


Figura 2

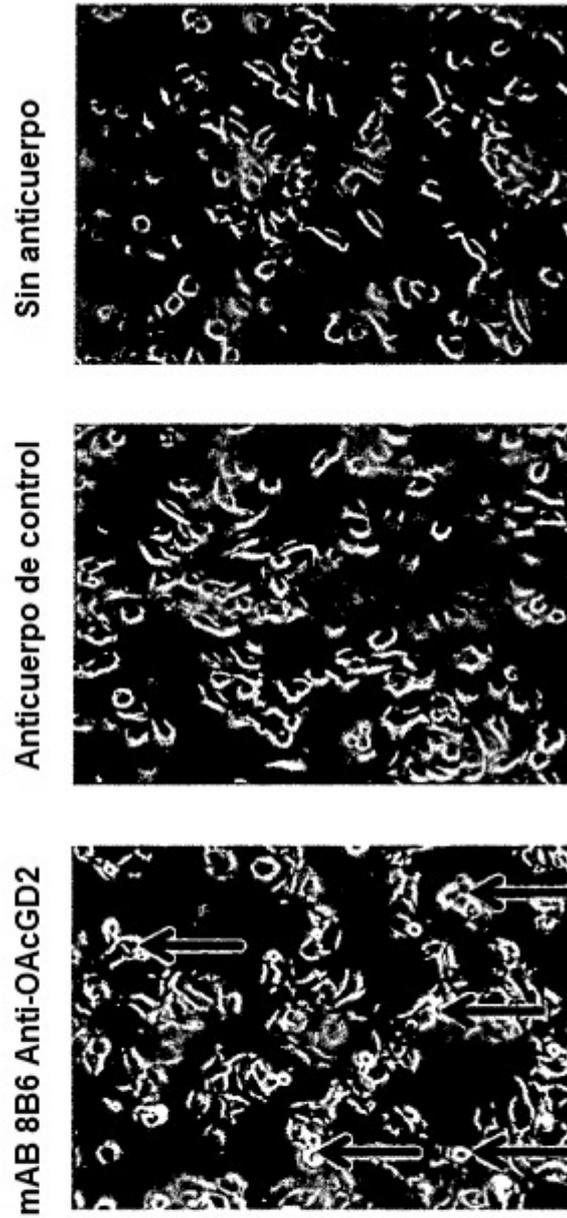


Figura 3

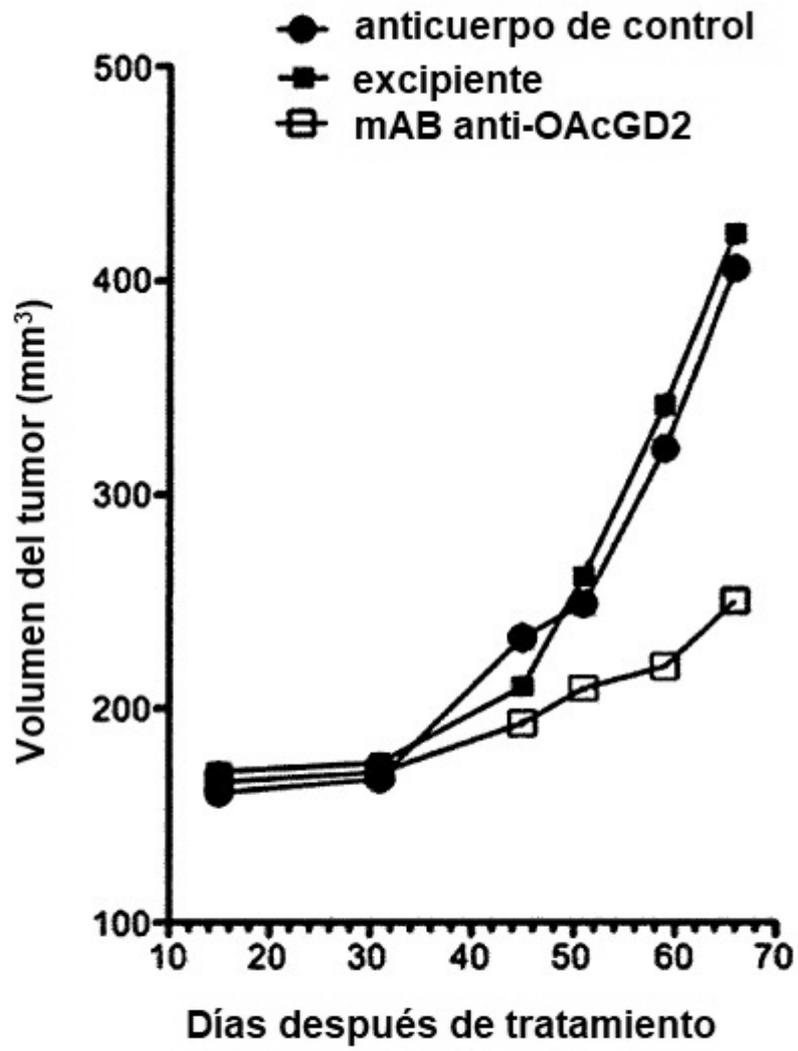


Figura 4

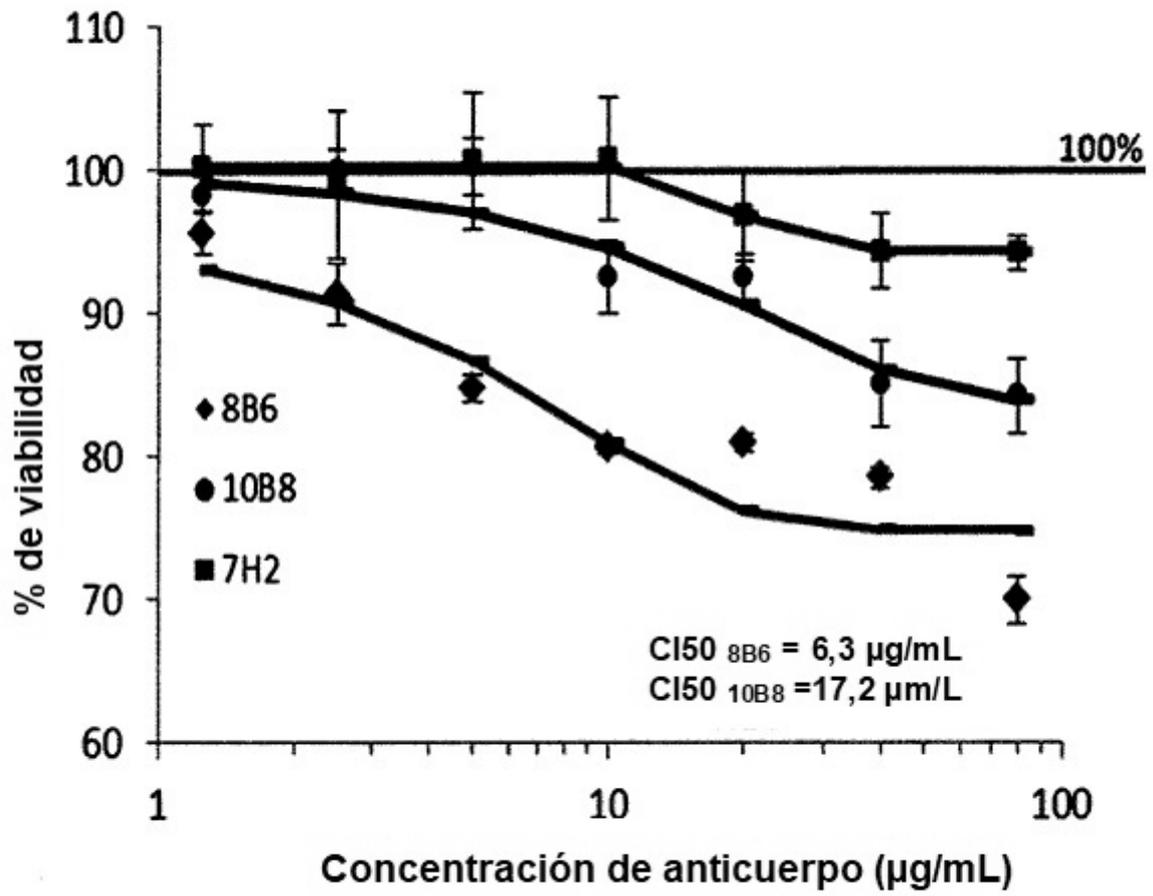


Figura 5

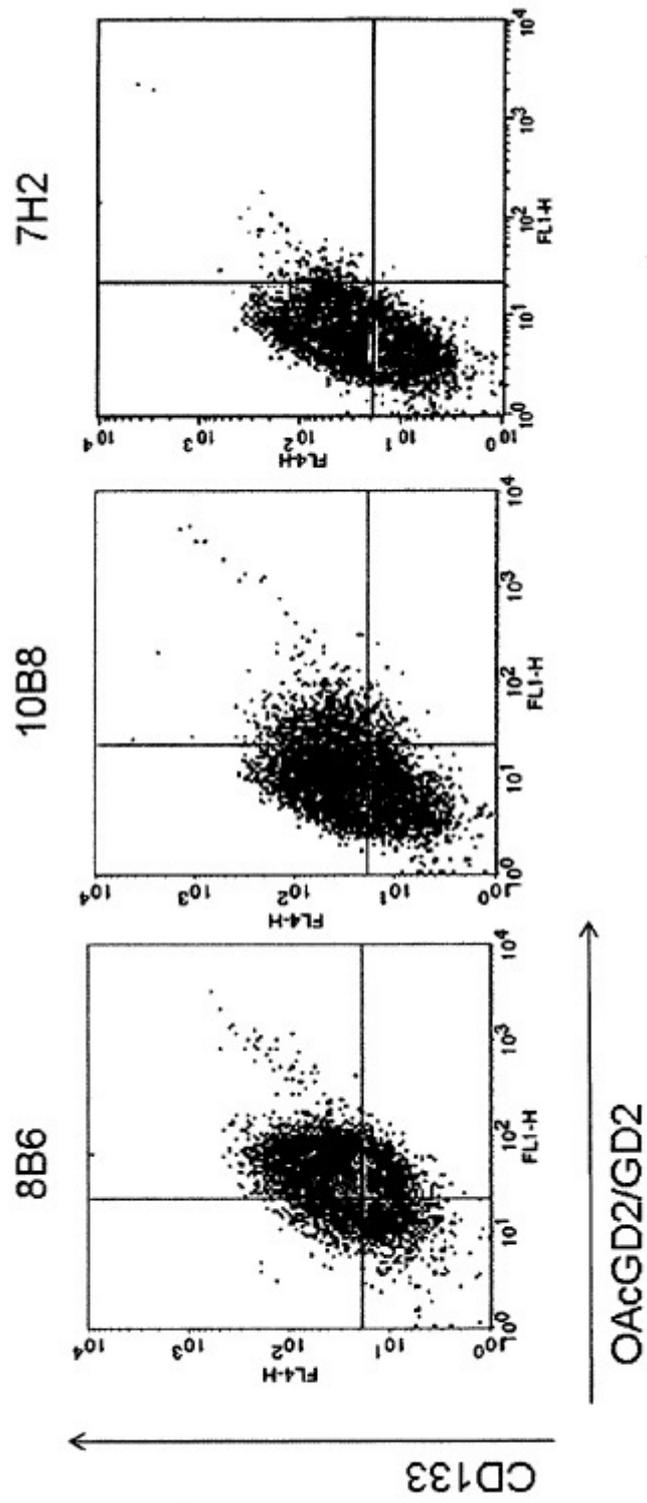


Figura 6