

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON ESPECIFICIDAD DUAL POR GANGLIÓSIDOS Y SU USO

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:	CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:	Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, Habana 11600, La Habana, P.O. Box 16040, CUBA	Domicilio/País de constitución:	CUBA - CIUDAD DE LA HABANA - LA HABANA
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE Número: 516861778784-			

3 Solicitantes

	Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1.	CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR	NN	516861778784

4 Datos del Inventor

Nombre:	ERNESTO MORENO FRIAS	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co	
Dirección:	Calle 174 edif BBE1 apart 16 entre 1ra y 5ta, Playa, CP 11600, La Habana, CUBA	Domicilio/País de constitución:	CUBA - CIUDAD DE LA HABANA - LA HABANA	
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica				
Número:		-		
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1.	MORENO FRIAS ERNESTO	CUBA		
2.	ROJAS DORANTES GERTRUDIS	CUBA		
3.	CASADESUS PAZOS ANA VICTORIA	CUBA		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	CUBA	CIUDAD DE LA HABANA	LA HABANA	Calle 174 edif BBE1 apart 16 entre 1ra y 5ta, Playa, CP 11600, La Habana, CUBA
2.	CUBA	CIUDAD DE LA HABANA	LA HABANA	Santa Irene No. 164 entre Flores y San Benigno, Santos Suárez, CP 10500, La Habana, CUBA

3.	CUBA	CIUDAD DE LA HABANA	LA HABANA	Santa Isabel No. 264 entre Santa Amalia y Arnao, Arroyo Naranjo, CP 10900, La Habana, CUBA
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:		Calle 94A No. 7A-09	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 39779654-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/CU2013/000001	Fecha Solicitud:	21/02/2013
Número Publicacion:		WO 2013/127373	Fecha Publicacion:	06/09/2013
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen CUBA	Codigo del país CU	(31) No. Solicitud CU/P/2012-0035	(32) Fecha 01/03/2012
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		22	Pago Reivindicaciones:	Si
11	Reducción de tasas.			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.				

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas

☐ Universidades públicas o privadas

☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12 Documentos Anexos

☒ Reivindicaciones

☒ Descripción

☐ Dibujos y/o Figuras

☒ Resumen

☐ Certificado Depósito Material Biológico

☐ Uso de Conocimiento tradicional

☒ Listado de secuencias

☐ Artes finales 12 x 12 cm

☒ Poderes, si fuere el caso

☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad

☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad

☒ Otros Anexos

ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON ESPECIFICIDAD DUAL POR GANGLIÓSIDOS Y SU USO

SECTOR TÉCNICO

5 La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología y particularmente con la salud humana. En la presente invención se describen anticuerpos monoclonales modificados por técnicas de ingeniería genética y el uso de estos anticuerpos y sus fragmentos en la terapia y/o el diagnóstico de tumores.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 como antígenos asociados a tumores

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico y que están presentes en las membranas plasmáticas de los vertebrados. Estas moléculas están involucradas en diversas funciones como la adhesión celular, la transducción de señales,
15 el desarrollo y diferenciación de tejidos, y también en la progresión tumoral (Hakomori, PNAS USA 99:225-32, 2002).

Varios gangliósidos han sido caracterizados como antígenos asociados a tumores debido a que aparecen expresados, o su expresión se incrementa en determinados tipos de cáncer. Entre estos gangliósidos asociados a tumores se encuentran el N-glicolil GM3 (NeuGc-GM3) y el N-acetil GM3 (NeuAc-GM3, o simplemente GM3).
20

El NeuGc-GM3 no se expresa en tejidos humanos normales (Varki, Biochimie 83:615-622, 2001), pero aparece expresado en varios tipos de tumores (Marquina y cols., Cancer Res 56:5165-71, 1996; Fernández y cols., Expert Rev Vaccines 2:817-23, 2003). La presente invención está relacionada con anticuerpos monoclonales que reconocen
25 con alta afinidad tanto al N-glicolil GM3 como al N-acetil GM3.

El N-acetil GM3 es común en los tejidos humanos normales (Svennerholm, in Structure and Function of Gangliosides, Plenum Press, New York-London, pp. 533-540, 1980; Prokazova y cols., Biochemistry (Moscow) 74:235-49, 2009), pero se definió también como un antígeno asociado a tumores porque se encuentra sobre expresado en diferentes
30 tipos de cáncer (Hersey y cols., Int J Cancer 41:336-43, 1988; Ravindranath y cols., Biochem Biophys Res Commun 353:251-8, 2007; Noguchi y cols., Glycobiology 16:641-50, 2006). En un reciente estudio organizado por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, dirigido a determinar qué antígenos se deben priorizar como dianas en la inmunoterapia del cáncer, el GM3 estuvo entre los 75 antígenos
35 seleccionados, ocupando el lugar 48 (Cheever y cols., Clinical Cancer Res 15: 5323-37, 2009).

Los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 tienen una estructura muy similar, compuesta por tres unidades sacarídicas (ácido siálico, galactosa y glucosa) y una cola de ceramida (Figura 1). Se diferencian entre sí únicamente por la hidroxilación del
40 grupo metilo presente en la función nitrogenada del ácido siálico N-acetil (NeuAc), que

da lugar al ácido siálico N-glicolil (NeuGc). O sea, el NeuAc- y el NeuGc-GM3 se diferencian entre sí solo por la sustitución de un átomo de hidrógeno por un grupo hidroxilo en el ácido siálico. Esta pequeña diferencia estructural, sin embargo, resulta en un reconocimiento diferenciado por el sistema inmune (Portoukalian, Clin Rev Allergy Immunol 19:73-78, 2000; Varki, Biochimie 83: 615-22, 2001).

Anticuerpos monoclonales que reconocen al N-acetil GM3

Varios anticuerpos monoclonales de origen humano o murino que reconocen al GM3 (N-acetil) se han descrito en la literatura: M2590 mAb (IgM murina) (Hirabayashi y cols., J Biol Chem 260:13328-33, 1985); FCM1 mAb (IgM humana) (Yamaguchi y cols., PNAS 84:2416-20, 1987); DH2 mAb (IgG murina) (Dohi y cols., Cancer Res 48, 5680-5, 1988); GMR6 mAb (IgM murina) (Kotani y cols., Biochim Biophys Acta 1117:97-103, 1992); L612 mAb (IgM humana) (Hoon y cols., Cancer Res 53:5244-20, 1993); los mAbs “17” y AH18 (human IgM) (Brandt y cols. Patent US005610280A, 1997); GMA1 mAb (IgG humana) (Mukerjee y cols., Hybridoma 17:133-42, 1998). De estos ocho anticuerpos, los mAbs DH2 y L612 han demostrado ser específicos por el GM3, mientras que los restantes seis anticuerpos muestran reactividad extendida a otros gangliósidos. Ninguno de estos anticuerpos ha mostrado reconocimiento del N-glicolil GM3, ni de otros gangliósidos N-glicolilados.

En un trabajo más reciente, tres anticuerpos anti-GM3 (llamados GM3A6, GM3A8, y GM3A15) fueron obtenidos a partir de una biblioteca de fragmentos Fv de cadena simple (scFv), expresados sobre la superficie de bacteriófagos. Dicha biblioteca fue construida a partir de los repertorios de genes de anticuerpo de un grupo de pacientes de cáncer (Lee y cols., J Am Chem Soc 124:12439-46, 2002). Las constantes de disociación (KD) de estos fragmentos scFv, medida por SPR/Biacore, fueron del orden de 10^{-5} - 10^{-7} M.

En general, la afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-gangliósidos es baja o mediana. Las constantes de disociación medidas por SPR/Biacore para fragmentos Fab de varios de estos anticuerpos, están en el orden de 10^{-6} - 10^{-7} M (Catimel y cols., Glycobiology 8:927-38; Boffey y cols., J Neuroimmunol 165:92-103, 2005; Townson y cols., Glycobiology 17:294-303, 2007), con raras excepciones, por ejemplo, de fragmentos anti-GD2 y anti-GD1b con KD del orden de 10^{-8} M (Boffey y cols., J Neuroimmunol 165:92-103, 2005; Hu y cols., J Immunol:183:5748-55, 2009).

En el caso particular del gangliósido N-acetil GM3, su baja inmunogenicidad es un fuerte obstáculo para obtener anticuerpos IgG de alta afinidad (Livingston y cols., Cancer Immunol Immunother 29:179-84, 1989; Portoukalian, Clin Rev Allergy Immunol 19:73-8, 2000).

Resultados preclínicos y clínicos con anticuerpos anti-N-acetil GM3

De los diferentes anticuerpos anti-GM3 descritos en la literatura, se han publicado evidencias de actividad anti-tumoral *in vitro* e *in vivo* para los mAbs DH2 y L612. El anticuerpo DH2 indujo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos *in vitro* e

5 inhibió el crecimiento de células de melanoma B16 en ratones C57BL/6 (Dohi y cols., Cancer Res 48, 5680-5, 1988). El mAb L612 produjo citotoxicidad dependiente de complemento en experimentos realizados *in vitro* con células de cáncer que expresan el GM3 (Nishinaka y cols., J Immunogenetics 48:73-5, 1998). Una versión ingenierizada de este anticuerpo, en formato de IgM hexamérica, mostró una capacidad incrementada

10 de producir muerte celular dependiente de complemento, y un mayor efecto anti-tumoral en ratones (Azuma y cols., Clin Cancer Res 13:2745-50, 2007).

El mAb L612 ha sido usado en la clínica, en un ensayo fase 1 que involucró a nueve pacientes con melanoma metastásico (Irie y cols., Cancer Immunol Immunother 53:110-7, 2004). Hasta el presente, este es el único ensayo clínico con un anticuerpo anti N-

15 acetil GM3 que ha sido documentado. Varios pacientes tuvieron respuestas clínicas al tratamiento. El anticuerpo, además, no produjo efectos tóxicos a pesar de la ubicuidad del N-acetil GM3 en los tejidos normales.

El N-acetil GM3 ha sido también diana de terapia activa en la clínica, en un ensayo fase 1 con la vacuna GM3/VSSP, en pacientes con melanoma (Guthmann y cols., J Immunother 27:242-51, 2004). Previamente, en un ensayo preclínico realizado en monos durante 12 meses, la vacuna generó una fuerte respuesta de anticuerpos anti-

20 GM3 de tipo IgM e IgG, y sin embargo, no produjo efectos tóxicos (Bada y cols., Exp Toxicol. 21:263-7, 2002). En el ensayo clínico, los anticuerpos anti-N-acetil-GM3 generados en los pacientes fueron de tipo IgM, y tampoco se observaron efectos tóxicos

25 de consideración.

Anticuerpos monoclonales que reconocen al N-glicolil GM3

Dos anticuerpos monoclonales que reconocen al N-glicolil GM3, pero no a su variante N-acetilada, han sido descritos en la literatura: el mAb P3 (IgM murina) (Vazquez y

30 cols., Hybridoma 14:551-56, 1995) y el mAb 14F7 (IgG murina) (Carr y cols., Hybridoma 19:241-47, 2000). El anticuerpo P3 reconoce también a otros gangliósidos N-glicolilados (Moreno y cols., Glycobiology 8, 695-708, 1998), mientras que el anticuerpo 14F7 ha demostrado ser específico por el N-glicolil GM3.

El diseño y la ingeniería genética de los anticuerpos que son objeto de la presente invención están basados en las secuencias aminoacídicas y la estructura cristalográfica de los dominios variables del anticuerpo 14F7 (Krengel y cols., J Biol Chem 279:5597-603, 2004).

35

El anticuerpo monoclonal 14F7

El anticuerpo monoclonal murino 14F7, producido por el hibridoma depositado con el número de acceso ECACC 98101901, está descrito en la solicitud de patente EP 0972782/A1. Variantes humanizadas y fragmentos de este anticuerpo se describen en la

5 solicitud de patente WO 2004/094477/A1.

El mAb 14F7 es una inmunoglobulina de isotipo IgG1 que reconoce al N-glicolil GM3 con alta especificidad (Carr y cols., Hybridoma 19:241-47, 2000) y alta afinidad, con una constante de disociación del orden de 10^{-8} M, medida para su fragmento scFv (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004). Estudios inmunohistoquímicos

10 han demostrado que el anticuerpo 14F7 reconoce varios tipos de tumores, como carcinoma ductal de mama y melanoma (Carr y cols., Hybridoma 19:241-47, 2000), adenocarcinomas de estómago, colon y páncreas (Blanco y cols., ISRN Gastroenterol, Article ID 645641, 2011), tumores del sistema genitourinario (Blanco y cols., ISRN Pathology, Article ID 953803, 2011) y tumores neuroectodérmicos (Scursoni y cols.,

15 Clin Devel Immunol, Article ID 245181, 2011).

El sitio de unión del mAb 14F7 al N-glicolil GM3 está ubicado en la región variable de su cadena pesada (VH), como fue demostrado a partir de la construcción de una biblioteca de fragmentos scFv expresados sobre bacteriófagos, que combinan el dominio VH del mAb 14F7 con una gran variedad de dominios variables de cadenas

20 ligeras (VL), tanto murinas como humanas (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004). Más de un tercio de los fragmentos de esta biblioteca fueron capaces de reconocer al N-glicolil GM3, lo cual demuestra además, que el dominio VH del mAb 14F7 puede asociarse a dominios VL diferentes y mantener la especificidad original del anticuerpo.

25 En estudios *in vitro* e *in vivo*, el mAb 14F7 fue capaz de provocar muerte celular independiente de complemento y de inhibir el crecimiento de mielomas en ratones (Carr y cols., Hybridoma 21:463-8, 2002). En un ensayo clínico prospectivo fase 1/2 realizado en pacientes con cáncer de mama, el anticuerpo 14F7 marcado con tecnecio se acumuló en los tumores (Oliva y cols., Breast Cancer Res Treat 96:115-21, 2006).

30 Estudios posteriores demostraron que el anticuerpo 14F7 mata las células tumorales, pero no células normales, mediante un novedoso mecanismo que provoca daños en la membrana celular (Roque-Navarro y cols., Mol Cancer Ther 7:2033-41, 2008). La alta afinidad del mAb 14F7 es un factor importante para producir este tipo de muerte, como demuestran experimentos recientes con un mutante del anticuerpo P3 con afinidad incrementada (Fernandez-Marrero y cols. Mol Immunol 48:1059-67, 2011). El anticuerpo P3, o su variante quimérica P3Q (que tiene la región variable del mAb P3 y

35 región constante de IgG1 humana), no es capaz de producir muerte celular independiente de complemento en células tumorales que expresan el N-glicolil GM3. Sin embargo, el mutante P3Q E99R obtenido por Fernandez-Marrero y colaboradores,

40 que tiene una mayor afinidad por el N-glicolil GM3 (intermedia entre la afinidad de los

mAbs P3Q y 14F7), sí es capaz de producir muerte celular independiente de complemento. El mAb 14F7, con mayor afinidad, tiene un efecto de muerte mayor que el producido por el mutante P3Q E99R.

5 *Terapias en la clínica que tienen como diana al N-glicolil GM3*

Hasta el presente, las evidencias de mayor peso de que anticuerpos que reconocen al gangliósido N-glicolil GM3 pueden tener un efecto antitumoral, provienen de los ensayos clínicos fase 2/3 de dos productos vacunales que tienen como diana a este gangliósido. Uno de estos productos es la vacuna NGcGM3/VSSP, que incluye en su
10 formulación la propia molécula de N-glicolil GM3, mientras que el otro es un anticuerpo antiidiotípico llamado Racotumumab o 1E10 (Fernández y cols., Clin Devel Immunol, Article ID 814397, 2010). Ambas vacunas producen altos títulos de anticuerpos anti-N-glicolil GM3 en pacientes de cancer, con un demostrado efecto antitumoral (Fernández y cols., Clin Devel Immunol, Article ID 814397, 2010;
15 Hernández y cols., J Immunol 186:3735-44, 2011).

Bibliotecas de fragmentos de anticuerpos expresados sobre bacteriófagos

Los anticuerpos con especificidad dual que son objeto de la presente invención, fueron obtenidos de una biblioteca combinatoria de fragmentos scFv expresados sobre
20 bacteriófagos filamentosos (o fagos, abreviadamente), la cual fue especialmente diseñada con ese objetivo.

La tecnología de presentación de fragmentos de anticuerpos sobre fagos (o “expresión en fagos”, abreviadamente) es una tecnología de alto flujo que permite la generación de bibliotecas que contienen un gran número de fragmentos (hasta miles de millones) con
25 secuencias aminoacídicas diferentes, y la selección subsecuente de los fragmentos que posean capacidades de unión deseadas en cuanto a especificidad y afinidad (Hoogenboom, Methods Mol Biol 178:1-37, 2002)

Anticuerpos de especificidad dual

30 El cáncer es una enfermedad caracterizada por heterogeneidad genética, lo cual hace difícil su tratamiento con un único agente terapéutico. Por esta razón las terapias combinatorias dirigidas a múltiples dianas moleculares asociadas a la enfermedad tienen una mayor probabilidad de éxito. En este sentido, es posible usar mezclas de anticuerpos con distintas especificidades, pero este tipo de terapia resulta muy cara
35 debido a los altos costos de desarrollo y manufactura de cada uno de los diferentes anticuerpos.

Con las técnicas de la ingeniería genética ha sido posible crear diversas soluciones para obtener anticuerpos, o fragmentos derivados de estos, con la capacidad de reconocer dos o más moléculas. Estos enfoques han consistido fundamentalmente en la combinación
40 de más de un sitio de unión de anticuerpo, cada uno con una especificidad diferente, en

una misma construcción molecular (Hudson y Souriau, Nat Med 9:129-34, 2003; Hollander, Immunotherapy 1:211-22, 2009).

Recientemente fue descrito un nuevo diseño conceptual de anticuerpo con doble especificidad, donde el sitio de unión de un anticuerpo monoclonal es se diseñó para
 5 que reconozca un segundo antígeno, manteniendo el reconocimiento por el antígeno original. Este nuevo diseño conceptual fue aplicado al anticuerpo Herceptin, haciendo uso de la tecnología de expresión en fagos, obteniéndose un mutante que además de mantener el reconocimiento de alta afinidad del antígeno original (la molécula HER2) reconoce también con alta afinidad al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)
 10 (Bostrom y cols., Science 323:1610-14, 2009). Este nuevo diseño conceptual de anticuerpo con especificidad dual (“dos en uno”) posee varias ventajas, entre ellas una muy importante: la facilidad de su producción como anticuerpo monoclonal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes que tienen especificidad dual y alta afinidad por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3. También se incluyen dentro del alcance de la invención fragmentos derivados de éstos anticuerpos.

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a los anticuerpos con
 20 especificidad dual y alta afinidad por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 donde dichos anticuerpos la región variable de la cadena pesada contiene las siguientes CDRs:

CDR-H1: GYRFRSYQIH, sec. con núm. de ident: 3

CDR-H2: YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17

25 CDR-H3: ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34

En otra modalidad la invención se refiere a anticuerpos caracterizados porque la secuencia de la región variable de la cadena pesada es: sec. con núm. de ident: 1,
 QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYRFRSYQIHWLKQRPDQGLEWIGYIDP
 ATAYTESNQKFKDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESPRLRRGIY
 30 YYAMDYWGQGTSVTVSS

En otra modalidad particular, la invención se refiere al anticuerpo monoclonal con regiones variables de cadena pesada y ligera con las secuencias: sec. con núm. de ident: 1,

QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYRFRSYQIHWLKQRPDQGLEWIGYIDP
 35 ATAYTESNQKFKDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESPRLRRGIY
 YYAMDYWGQGTSVTVSS

y

sec. con núm. de ident: 2:

DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSCRASQSSISNNLHWYQQRTHESPRLLIKYSQSSIS
 40 GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFCQQSNRWPLTFGAGTKLELKRA

En otro aspecto la invención se refiere al anticuerpo monoclonal con región variable de pesada con sec. con núm. de ident: 1:

QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYRFRSYQIHWLKQRPDQGLEWIGYIDP
 5 ATAYTESNQKFKDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESPRLRRGIY
 YYAMDYWGQGTSTVTVSS y la secuencia de la región variable de la cadena ligera es cualquier secuencia de región variable de cadena ligera de un anticuerpo.

En otro aspecto la región variable de la cadena ligera es cualquier región variable de cadena ligera de un anticuerpo humano.

10 En otro aspecto particular la región variable de la cadena ligera es cualquier región variable de cadena ligera de un anticuerpo humanizado.

En una modalidad preferida la presente invención se refiere al anticuerpo caracterizado porque el dominio de unión al antígeno comprende una secuencia de la CDR-H1 que se selecciona del grupo que consiste de:

- 15 CDR-H1 GYRFRSYQIH, sec. con núm. de ident: 3
- CDR-H1 GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 4
- CDR-H1 GYRFTSNQIH, sec. con núm. de ident: 5
- CDR-H1 GYSFNRYQIH, sec. con núm. de ident: 6
- CDR-H1 GYSFRRYQIH, sec. con núm. de ident: 7
- 20 CDR-H1 GYSITRYQIH, sec. con núm. de ident: 8
- CDR-H1 GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 9
- CDR-H1 GYSFKSYQIH, sec. con núm. de ident: 10
- CDR-H1 GYSFTSYQIH, sec. con núm. de ident: 11
- CDR-H1 GYRFTRYWIH, sec. con núm. de ident: 12
- 25 CDR-H1 GYTFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 13
- CDR-H1 GYPFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 14
- CDR-H1 GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
- CDR-H1 GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16

En otra modalidad el anticuerpo de la presente invención se caracteriza porque la
 30 secuencia de la CDR-H2 se selecciona del grupo que consiste de:

- CDR-H2 YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17
- CDR-H2 YINPATASTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 18
- CDR-H2 FIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 19
- CDR-H2 DIDPGRAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 20
- 35 CDR-H2 YIDPATANTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 21
- CDR-H2 FINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 22
- CDR-H2 FIDPASAYTVSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 23
- CDR-H2 YIDPATAKTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 24
- CDR-H2 YINPGSAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 25
- 40 CDR-H2 YLDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 26

- CDR-H2 YVDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 27
- CDR-H2 YINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 28
- CDR-H2 YIDPATAWTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 29
- CDR-H2 YIDPGTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 30
- 5 CDR-H2 YIDPRTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 31
- CDR-H2 YVDPATAHTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 32
- CDR-H2 YINPATAYTDSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 33
- En aun otra modalidad, el anticuerpo de la presente invención se caracteriza porque la secuencia de la CDR-H3 se selecciona del grupo que consiste de:
- 10 CDR-H3 ESPRLRRGIYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
- CDR-H3 ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
- CDR-H3 ESPRMRRGIYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
- CDR-H3 ESPRVRRGIYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
- CDR-H3 ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38
- 15 En otra modalidad el anticuerpo de la invención comprende cualquier combinación de secuencias de las CDRs H1, H2 y H3 de las reivindicaciones enumeradas anteriormente. En otra modalidad el anticuerpo de la invención se caracteriza porque la secuencia del CDR-H2 y/o la secuencia del CDR-H3 contienen al menos una de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de:
- 20 CDR-H2 Asp 52 sustituida por Ala, Glu, Asn, Ser o Thr
- CDR-H2 Ala 53 sustituida por Asp, Glu, Gly, His, Leu, Ser, Thr o Tyr
- CDR-H3 Arg 100-Arg 100A sustituidas por Ala-Lys, His-Arg o Thr-Arg
- CDR-H3 Gly 100B sustituida por Ala, Asp, Phe, Leu, Gln, Arg o Ser
- CDR-H3 Tyr 100 D sustituida por Phe
- 25 Y adicionalmente comprende cualquier cadena ligera de anticuerpo
- En otra modalidad particular la invención comprende las regiones constantes IgG1 humana para cadena pesada y CK para la cadena ligera.
- En otro aspecto la presente invención se refiere a los fragmentos Fab, Fab', (Fab)₂ y scFv de los anticuerpos de la presente descripción.
- 30 Los fragmentos de la presente invención se caracterizan por:
una secuencia de la CDR-H1 que se selecciona del grupo que consiste de:
- CDR-H1 GYRFRSYQIH, sec. con núm. de ident: 3
- CDR-H1 GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 4
- CDR-H1 GYRFTSNQIH, sec. con núm. de ident: 5
- 35 CDR-H1 GYSFNRYQIH, sec. con núm. de ident: 6
- CDR-H1 GYSFRRYQIH, sec. con núm. de ident: 7
- CDR-H1 GYSITRYQIH, sec. con núm. de ident: 8
- CDR-H1 GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 9
- CDR-H1 GYSFKSYQIH, sec. con núm. de ident: 10
- 40 CDR-H1 GYSFTSYQIH, sec. con núm. de ident: 11

- CDR-H1 GYRFTRYWIH, sec. con núm. de ident: 12
 CDR-H1 GYTFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 13
 CDR-H1 GYPFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 14
 CDR-H1 GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
 5 CDR-H1 GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16
 una secuencia de la CDR-H2 que se selecciona del grupo que consiste de:
 CDR-H2 YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17
 CDR-H2 YINPATASTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 18
 CDR-H2 FIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 19
 10 CDR-H2 DIDPGRAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 20
 CDR-H2 YIDPATANTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 21
 CDR-H2 FINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 22
 CDR-H2 FIDPASAYTVSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 23
 CDR-H2 YIDPATAKTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 24
 15 CDR-H2 YINPGSAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 25
 CDR-H2 YLDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 26
 CDR-H2 YVDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 27
 CDR-H2 YINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 28
 CDR-H2 YIDPATAWTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 29
 20 CDR-H2 YIDPGTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 30
 CDR-H2 YIDPRTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 31
 CDR-H2 YVDPATAHTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 32
 CDR-H2 YINPATAYTDSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 33
 una secuencia de la CDR-H3 que se selecciona del grupo que consiste de:
 25 CDR-H3 ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
 CDR-H3 ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
 CDR-H3 ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
 CDR-H3 ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
 CDR-H3 ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38
 30 En otra modalidad el fragmento de la invención comprende cualquier combinación de
 secuencias de las CDRs H1, H2 y H3 enumeradas anteriormente.
 Estos anticuerpos y sus fragmentos son útiles para los fines diagnósticos y terapéuticos
 que se exponen en la presente descripción. Por lo que en otro aspecto la presente
 invención se refiere a composiciones que comprenden los anticuerpos de la presente
 35 descripción y/o fragmentos de éstos para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades
 relacionadas con los antígenos gangliósidos N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3.
 Preferentemente, la presente invención engloba composiciones, incluidas
 composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o varios anticuerpos, o fragmentos
 derivados de estos anticuerpos, con especificidad dual y alta afinidad por los
 40 gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3. Con mayor preferencia, la invención

- comprende composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo y/o fragmento de la presente invención y un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Con aun mayor preferencia la presente invención comprende un anticuerpo con la región variable de la cadena pesada de sec. con núm. de ident: 1 y la región variable de la cadena ligera de sec. con núm. de ident: 2.
- En un aspecto la presente invención también se refiere a métodos de tratamiento que comprenden los anticuerpos de la invención y fragmentos de éstos a sujetos portadores de tumores que expresan al menos uno de los antígenos gangliósido N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3. En una modalidad particular el sujeto es un humano.
- En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un juego de reactivos útil en el diagnóstico de tumores, que comprende al menos uno de los anticuerpos de la invención y/o fragmentos derivados de éstos. En una modalidad particular el método comprende pero no se limita al diagnóstico, por ejemplo, en base a la presencia del antígeno asociado a la patología, por ejemplo el gangliósido N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3 en una muestra de tejido o fluido del paciente, por ejemplo, una muestra de tejido tumoral, muestra de sangre, etc.

Método de obtención de los anticuerpos de la invención

Diseño y construcción de la biblioteca de fragmentos scFv, basada en el mAb 14F7

- Los anticuerpos que son objeto de esta invención se obtuvieron a partir de una biblioteca de genes de fragmentos de regiones Fv de cadena simple (scFv), diseñada especialmente con ese propósito. La racionalidad y originalidad del diseño estuvieron dadas en primer lugar por la selección cuidadosa de las posiciones a aleatorizar en la secuencia de aminoácidos de los fragmentos de anticuerpo, restringiendo las mutaciones a la zona más probable de interacción con el antígeno.
- En la presente descripción se usa el esquema de numeración de Kabat para numerar la secuencia de la región VH del anticuerpo. Para los anticuerpos y sus fragmentos que son objeto de la presente invención, este esquema de numeración introduce letras de inserción en la región VH, después de las posiciones 52 (52A), 82 (82A a 82C) y 100 (100A a 100H).
- Como cadena ligera (dominio VL) de los fragmentos scFv de la biblioteca, se escogió la cadena ligera del fragmento 3Fm, que se obtuvo en un trabajo anterior (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004). Este fragmento contiene el dominio VH del mAb 14F7, mientras que su dominio VL se extrajo de una biblioteca de cadenas ligeras murinas y no está relacionado con el dominio VL original del mAb 14F7. Sin embargo, a pesar de tener una cadena ligera diferente, el fragmento 3Fm mantuvo la especificidad y alta afinidad por el NeuGc-GM3 del mAb 14F7 y además se pudo expresar en bacteria. Tomando en cuenta los datos experimentales obtenidos por Rojas y colaboradores (J Immunol Methods 293:71-83, 2004) y por Krengel y colaboradores (J Biol Chem 279:5597-603, 2004), los cuales indican que la cadena ligera no es

importante en el reconocimiento del antígeno, la secuencia de esta cadena se mantuvo invariable en la biblioteca.

El diseño de las cadenas pesadas de los fragmentos de la biblioteca tuvo como base la secuencia de la región VH del anticuerpo 14F7. A partir del análisis de la estructura cristalográfica del fragmento Fab del mAb 14F7 (Krengel y cols., J Biol Chem 279:5597-603, 2004), y conociendo además que el dominio VH es el que determina la unión de este anticuerpo al N-glicolil GM3, se seleccionó un conjunto de posiciones a mutar en los lazos hipervariables del dominio VH. La selección de las posiciones a mutar se basó en dos criterios principales: 1) mutar preferentemente los aminoácidos cuyas cadenas laterales están expuestas al solvente; y 2) la zona de las mutaciones se circunscribió a posiciones dentro de un radio de 12 angstroms de la posición 52 de VH. Este último criterio se basó en experimentos de mutagénesis informados por Krengel y cols. (J Biol Chem 279:5597-603, 2004), los cuales evidencian que el aminoácido Asp 52 está involucrado en la interacción del anticuerpo 14F7 con su antígeno.

En total, 20 posiciones del sitio de unión en VH fueron sometidas a una aleatorización suave (Fairbrother y cols., Biochemistry 37:17754-64, 1998) ajustando el proceso de síntesis génica del dominio VH, lo que permitió introducir cualquiera de los veinte aminoácidos naturales en cada posición a mutar, manteniendo al mismo tiempo, en cada molécula individual, un grado limitado de divergencia de su cadena pesada con respecto a la cadena VH original del anticuerpo 14F7.

Las posiciones sometidas a aleatorización fueron las siguientes: Ser 28, Phe 29, Thr 30, Ser 31, Trp 33, Ile 34, Tyr 50, Ile 51, Asp 52, Ala 53, Thr 54, Tyr 56, Glu 58, Arg 98, Leu 99, Arg 100, Arg 100A Gly 100B, Ile 100C y Tyr 100D.

Tres de las posiciones a mutar, Phe 29, Ile 34 e Ile 51, corresponden a aminoácidos hidrofóbicos que tienen su cadena lateral enterrada en el interior de la proteína, los cuales son importantes para mantener la conformación de los CDRs H1 y H2. Para estos tres aminoácidos en particular, así como para Leu 99 en el CDR H3, se utilizaron codones especialmente diseñados: TTT, ATT, ATT y TTG, respectivamente, donde los nucleótidos subrayados representan la mezcla de dicho nucleótido (85%) con una mezcla equimolar de los restantes tres nucleótidos (15%). Estos codones parcialmente degenerados codifican para aminoácidos hidrofóbicos, privilegiando la inserción del aminoácido original en cada posición. El propósito de este diseño fue generar una diversidad limitada, que pudiera tener solo efectos muy ligeros en la conformación de los CDRs, con posibles efectos de modulación de la afinidad por el antígeno.

Tomando en consideración que Krengel y colaboradores (J Biol Chem 279:5597-603, 2004) demostraron que el aminoácido Asp 52 es importante para la unión al NeuGc-GM3, para este aminoácido se diseñó una mezcla particular de codones (G-80%/A-20%)A(C-50%/T-50%) que codifican para seis aminoácidos diferentes, en su mayoría con cadenas laterales de pequeño y mediano tamaño, entre los cuales predomina el ácido aspártico original. Para las restantes 15 posiciones aleatorizadas, cada base del

triplete que codifica para esa posición fue sintetizada utilizando una mezcla de nucleótidos que contenía un 85% del nucleótido original y un 15% de una mezcla equimolar de los restantes tres nucleótidos.

La colección de genes VH diseñada fue sintetizada y clonada en un fagemido pHAB
5 que contiene el gen del fragmento scFv 3Fm (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004). Los fagos presentadores de fragmentos scFv fueron rescatados de la biblioteca usando el fago auxiliar M13 K07 y posteriormente purificados utilizando el protocolo descrito por Marks y colaboradores (J Mol Biol 222:581-97, 1991).

La obtención de fragmentos de anticuerpos mutantes del 14F7 con la capacidad de
10 reconocer al gangliósido N-acetil GM3 con alta afinidad, y manteniendo al mismo tiempo el reconocimiento de alta afinidad del N-glicolil GM3, fue un resultado sorprendente. Los cambios de aminoácidos en la cadena pesada del anticuerpo 14F7, que confirieron las nuevas propiedades a los mutantes, no eran predecibles a partir de las piezas de conocimiento acumuladas anteriormente. La obtención de anticuerpos con
15 especificidad dual fue posible gracias al diseño racional de la biblioteca donde se combinó el procedimiento de aleatorización suave con una selección cuidadosa de la posiciones a mutar, basada en conocimiento estructural, para concentrar la diversidad de la biblioteca en la zona del sitio de unión del anticuerpo que es relevante para la unión de su antígeno.

20

Selección de fragmentos scFv con especificidad dual

Los fragmentos de anticuerpo con especificidad dual por los gangliósidos N-glicolil GM3 y N-acetil GM3 que son objeto de la presente invención, fueron obtenidos mediante tres rondas de selección y amplificación de fagos de la biblioteca, utilizando
25 como molécula diana únicamente al N-acetil GM3, ya que una simple ronda de selección contra el N-glicolil GM3 realizada previamente demostró que la biblioteca contenía una gran cantidad de fragmentos capaces de reconocer este antígeno.

El proceso de selección se realizó siguiendo un procedimiento similar al descrito por Rojas y cols. (J Immunol Methods 293:71-83, 2004) Células TG1en crecimiento
30 exponencial fueron usadas para rescatar los fagos seleccionados a una escala de 50 mililitros, como se describe en (Marks y cols., J Mol Biol 222:581-97, 1991). Los fagos purificados fueron utilizados como material de partida para la siguiente ronda de selección. Después de tres rondas, clones de fagos seleccionados individualmente fueron rescatados en placas de 96 pozos (Marks y cols., J Mol Biol 222:581-97, 1991).

35 La capacidad de los fagos seleccionados de unirse al N-acetil GM3 y al N-glicolil GM3 fue evaluada por ELISA siguiendo un procedimiento similar al descrito en (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004). Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de anticuerpo que mostraron mayor capacidad de unirse a ambos gangliósidos fueron determinadas por la compañía MacroGen (Korea).

40

Caracterización del sitio de unión de los anticuerpos con especificidad dual

- Además de los fragmentos con especificidad dual por NeuAc-GM3 y NeuGc-GM3, también fueron secuenciados otros fragmentos de anticuerpo derivados de la biblioteca que solo reconocen al N-glicolil GM3, así como fragmentos que no fueron capaces de reconocer a ninguno de los dos gangliósidos en experimentos de ELISA.
- Adicionalmente, y partiendo de uno de los fragmentos con especificidad dual seleccionados de la biblioteca, se estudió la influencia de un grupo particular de posiciones de la región VH, realizando una aleatorización exhaustiva de manera individual para cada posición.
- Estos estudios permitieron determinar en detalle cuáles de los aminoácidos del sitio de unión del anticuerpo son los más importantes para el reconocimiento dual del N-glicolil GM3 y del N-acetil GM3. En la Tabla 1 se muestra un grupo de secuencias de los CDRs de la cadena pesada de fragmentos scFv con especificidad dual, extraídos de la biblioteca. En la Tabla 2 se muestran las posiciones en la secuencia del dominio VH que son relevantes para la especificidad dual, y las posiciones que admiten diferentes grados de variabilidad en aminoácidos.
- Solo dos o tres mutaciones en el CDR H1 fueron suficientes para conferir a los fragmentos de anticuerpo la capacidad de unirse también al N-acetil GM3, además de al N-glicolil GM3. En particular, las sustituciones Ser 28 → Arg, Thr 30 → Arg y Trp 33 → Gln produjeron un mutante (mutante RRQ) con alta afinidad por ambos gangliósidos.

Construcción de inmunoglobulinas recombinantes con especificidad dual por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3

- La presente invención comprende inmunoglobulinas de cualquier isotipo, ya sea de origen humano, murino o de otra especie, así como cualquier tipo de fragmento de estas inmunoglobulinas, que tengan especificidad dual por los gangliósidos NeuAc-GM3 y NeuGc-GM3. Una inmunoglobulina de cualquier isotipo deseado se puede construir a partir de la secuencia de aminoácidos de la región VH de un fragmento scFv con la capacidad de unirse a ambos gangliósidos, y de una secuencia de región VL de procedencia murina, humana, o de otra especie. Este propósito se puede lograr empleando técnicas establecidas de la biología molecular, utilizando cualquiera de los vectores descritos para la expresión eficiente de proteínas recombinantes, particularmente de anticuerpos monoclonales.
- En una forma de realización, se puede construir una inmunoglobulina de isotipo IgG1 utilizando los vectores pAH4604 y pAG4622 (Coloma y cols., J Immunol Methods 52:89-104, 1992), comúnmente usados para la expresión de inmunoglobulinas en células superiores.
- La secuencia VH a utilizar para construir una inmunoglobulina con especificidad dual por los gangliósidos NeuAc-GM3 y NeuGc-GM3, puede ser extraída directamente de la

biblioteca de fagos construida en la presente invención, o puede ser diseñada a partir de los datos experimentales mostrados en la Tabla 1, conservando en la secuencia las posiciones importantes para la especificidad dual e introduciendo cualquiera de los aminoácidos apropiados en las posiciones de los CDRs que permiten algún grado de

5 variabilidad. La secuencia VL a utilizar admite un alto grado de variabilidad, tanto en las regiones marco como en los lazos hipervariables, como fue demostrado en (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004).
En otra forma de realización, la presente invención incluye también inmunoglobulinas quiméricas, o sea, con regiones constantes humanas y regiones variables humanas, así
10 como inmunoglobulinas con regiones variables humanizadas.

Composiciones farmacéuticas

En una forma de realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la presente invención, o fragmentos de éstos.

15 En una forma de realización, estas composiciones farmacéuticas comprenden también un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable o adyuvante" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y
20 similares, compatibles con la administración farmacéutica. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. El término "vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable " se refiere a un vehículo o adyuvante que se puede administrar a un sujeto, junto con los anticuerpos o fragmentos, y que no destruye la actividad farmacológica de éstos y no es tóxico cuando se
25 administra en dosis suficientes para entregar una cantidad terapéutica de los anticuerpos.

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de rutas de administración incluyen entre otras parenteral, por ejemplo, parenteral, intradérmica intravenosa y subcutánea. Las soluciones o suspensiones que se usan para aplicación parenteral, intradérmica o
30 subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales
35 como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Es ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para
40 facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación

unitaria como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

- 5 Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

Métodos de tratamiento

- 10 Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de tumores que expresen el gangliósido N-acetil GM3, o el gangliósido N-glicolil GM3, o ambos gangliósidos simultáneamente.

- Una dosis terapéutica adecuada de los anticuerpos de la presente invención está en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1 g por dosis, preferentemente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg por dosis. Los anticuerpos de
15 la invención se administran por cualquier medio adecuado, incluyendo las vías parenteral, subcutánea, intrapulmonar, intranasal e intracraneal, y si se desea para tratamiento local, la vía intralesional.

- Un método de tratamiento comprende la administración al paciente de la composición farmacéutica de la invención en un esquema de dosis de los conocidos por aquellos con
20 experiencia en la materia para la terapia pasiva con anticuerpos monoclonales o fragmentos de éstos. Un ejemplo de método de tratamiento, pero que no limita la presente invención comprende la administración de una dosis semanal de 200 mg de un anticuerpo de la presente invención durante por ejemplo 6 semanas y posteriormente dosis de mantenimiento por ejemplo cada 2 o 3 semanas hasta progresión de la
25 enfermedad o toxicidad limitante.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

- La Figura 1:** A) Reconocimiento por el mAb 7C1 de los gangliósidos N-glicolil GM3 y N-acetil GM3, en ensayos de ELISA, utilizando diferentes concentraciones del
30 anticuerpo. B) Reconocimiento en ensayos de ELISA del gangliósido N-glicolil GM3 por los anticuerpos 14F7hT (versión humanizada del mAb 14F7 con isotipo IgG1 humano), 7C1 y T1h (anticuerpo humanizado usado como control negativo. C) Inmunotinción sobre placas de TLC de los gangliósidos N-acetil GM3 y N- glicolil GM3 (carriles 1 y 2, respectivamente, en cada una de las 4 placas). De izquierda a
35 derecha: revelado de ambos gangliósidos con orcinol, e inmunotinción con los anticuerpos 14F7hT, 7C1 y T1h, respectivamente. Solo el anticuerpo 7C1 mostró reactividad con N-acetil GM3. D) Reconocimiento en ensayos de ELISA de un panel de

diferentes gangliósidos, por los anticuerpos 14F7hT y 7C1.

La Figura 2. Reconocimiento por el mAb 7C1 de líneas celulares tumorales que expresan N-acetil GM3 o N-glicolil GM3, en experimentos de citometría de flujo. A) Marcaje de la línea tumoral transformada L1210-SH, que expresa solo N-acetil GM3. B) Marcaje de la línea L1210 nativa, que expresa mayoritariamente N-glicolil GM3.

La Figura 3. Efecto citotóxico del anticuerpo 7C1 sobre células tumorales que expresan N-acetil GM3 o N-glicolil GM3, en comparación con el anticuerpo 14F7hT. A) Efecto de muerte celular sobre la línea L1210 nativa. B) Efecto citotóxico sobre la línea transformada L1210-SH. C) Tabla resumen con los resultados numéricos del experimento.

La Figura 4. A) Reconocimiento de esplenocitos de ratones Balb/c por el anticuerpo humanizado 7C1, en experimentos de citometría de flujo. B) Ensayos de viabilidad celular con linfocitos B de ratón Balb/c purificados, tratados con el anticuerpo 7C1. En ambos experimentos los linfocitos B fueron marcados con un anticuerpo policlonal anti-B220 y se utilizó el anticuerpo humanizado C5Q como control irrelevante.

20 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Construcción de una inmunoglobulina recombinante de isotipo IgG1 con especificidad dual por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 (anticuerpo 7C1).

A partir de la secuencia de aminoácidos de la región VH de los fragmento scFv con especificidad dual por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3, se diseñó un gen que codifica para este dominio, el cual además se optimizó para expresión en células de mamífero. De forma similar, se diseñó un gen que codifica para la región VL original del anticuerpo 14F7. Ambos genes fueron sintetizados por la compañía Geneart (Alemania).

El dominio VH seleccionado tiene solo tres mutaciones a nivel de aminoácidos con respecto a la secuencia original del anticuerpo 14F7. Estas tres mutaciones son: Ser 28 → Arg, Thr 30 → Arg y Trp 33 → Gln.

Los genes codificantes para VH y VL se clonaron en los vectores pAH4604 y pAG4622 (Coloma y cols., J Immunol Methods 52:89-104, 1992), respectivamente, siguiendo procedimientos conocidos de la biología molecular. Estos vectores son usados para la expresión de inmunoglobulinas en células superiores. El vector pAH4604 contenía la

región constante humana de isotipo IgG1, mientras que el vector pAG4622 contenía la región constante kappa humana. Para expresar la inmunoglobulina recombinante se utilizaron células de mieloma murino Sp2/0, que no produce anticuerpos, las cuales se transfectaron secuencialmente con las construcciones genéticas obtenidas para VH y VL. La inmunoglobulina producida por estas células se purificó mediante el uso de una columna de proteína A.

El anticuerpo monoclonal recombinante producido recibió el nombre de 7C1.

La capacidad del anticuerpo recombinante 7C1 de unirse a los gangliósidos NeuAc-GM3 y NeuGc-GM3 fue medida por ELISA para diferentes concentraciones de la inmunoglobulina, siguiendo un procedimiento similar al descrito por Rojas y cols. (J Immunol Methods 293:71-83, 2004).

El mAb 7C1 fue capaz de unirse a ambos gangliósidos prácticamente con la misma afinidad, como se muestra en la Figura 1A, donde se observa que las curvas de densidad óptica (DO) que cuantifican el nivel de reconocimiento de los gangliósidos NeuAc-GM3 y NeuGc-GM3 por el anticuerpo 7C1, son muy similares entre sí. Además, la afinidad de unión del anticuerpo 7C1 al N-glicolil GM3 (y por transición, también al N-acetil GM3) es muy similar (solo ligeramente por debajo) a la observada para la unión del mAb 14F7 con el N-glicolil GM3, como se muestra en la Figura 1B.

En estos experimentos se utilizó una versión humanizada del mAb 14F7 con isotipo IgG1 humano, llamada 14F7hT, la cual conserva las propiedades de reconocimiento del anticuerpo 14F7 original (Fernandez-Marrero y cols., Immunobiology 216:1239-47, 2011). Como control negativo se utilizó el anticuerpo T1h (anti-CD6), también con isotipo IgG1 humano.

Adicionalmente, la capacidad de unión del anticuerpo 7C1 a los dos gangliósidos fue comprobada por cromatografía en capa fina (TLC), como se muestra en la Figura 1C, donde se observa que el mAb 7C1 fue capaz de marcar las muestras purificadas de N-acetil GM3 y N-glicolil GM3.

La especificidad del anticuerpo 7C1 es verdaderamente dual, no múltiple, como se prueba en la Figura 1D, donde se muestra que este anticuerpo no reconoció ninguna de las moléculas de un diverso panel de gangliósidos, tanto de tipo N-acetil como N-glicolil

Ejemplo 2. Reconocimiento por el anticuerpo 7C1 de líneas celulares tumorales que expresan N-acetil GM3 o N-glicolil GM3.

La capacidad del anticuerpo 7C1 de reconocer células tumorales que expresan el gangliósido N-glicolil GM3 o el N-acetil GM3 fue demostrada mediante experimentos de citometría de flujo utilizando dos variantes de la línea celular L1210 (comprada a la American Type Culture Collection), que es una línea de leucemia linfocítica de ratón. Se utilizó la propia cepa nativa de dicha línea, que expresa N-glicolil GM3, y una variante

transformada genéticamente (L1210-SH), que expresa N-acetil GM3 (Fernández-Marrero y cols., Mol Immunol 48:1059-67, 2011).

La alta expresión de N-glicolil GM3 por la línea L1210, evidenciada por el marcado reconocimiento de esta línea por el anticuerpo 14F7, fue demostrada por Roque-Navarro y cols. (Mol Cancer Ther 7:2033-41, 2008). El análisis por extracción del contenido de gangliósidos de estas células dio como resultado una proporción de 85:15 de NeuGc-GM3/NeuAc-GM3.

La línea L1210-SH, que expresa N-acetil GM3 en lugar de N-glicolil GM3, fue obtenida mediante la transducción lentiviral de un fragmento de RNA de interferencia que inhibe la expresión de la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa, la cual transforma el ácido siálico N-acetil en ácido siálico N-glicolil (Shaw and Schauer, Biol Chem Hoppe Seyler 369:477-86, 1988). La disminución drástica de la expresión de N-glicolil GM3 en esta línea transformada fue demostrada por Fernández-Marrero y cols. (Mol Immunol 48:1059-67, 2011).

Los experimentos de citometría de flujo se realizaron en un equipo FACScan (Becton Dickinson). En cada ensayo se recolectaron 104 células. Para el marcaje fluorescente de las células se utilizó un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con FITC. Como control negativo se utilizó el anticuerpo T1h.

Como se muestra en la Figura 2A, el anticuerpo 7C1 fue capaz de marcar las células de la línea L1210-SH (que expresan N-acetil GM3), a diferencia del anticuerpo 14F7hT que no reconoce dichas células. Por otro lado, el anticuerpo 7C1 también marcó las células de la cepa nativa de L1210 (que tienen una alta expresión de N-glicolil GM3), las cuales fueron marcadas también por el anticuerpo 14F7hT utilizado en este caso como control positivo (Figura 2B). Es de destacar que el marcaje de la cepa nativa de L1210 por el mAb 7C1 fue más intenso comparado con el marcaje por el mAb 14F7hT, debido a que el mAb 7C1 puede unirse tanto a la variante N-glicolil como a la variante N-acetil del GM3, expresadas ambas en estas células.

Ejemplo 3. Efecto citotóxico del anticuerpo 7C1 sobre células tumorales que expresan N-acetil GM3 o N-glicolil GM3.

La capacidad del anticuerpo 7C1 de matar células tumorales que expresan N-acetil GM3 o N-glicolil GM3, por un mecanismo de muerte celular independiente de complemento, fue demostrada en experimentos realizados con las líneas celulares L1210 y L1210-SH. Para inducir la muerte con el anticuerpo, las células fueron suspendidas en medio de cultivo con 1% de suero fetal bovino a una concentración de 1 millón de células por mililitro, y luego incubadas con el anticuerpo en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 grados centígrados durante 3 horas. Posteriormente las células fueron lavadas, suspendidas en PBS con yoduro de propidio (PI) a 10 microgramos/mililitro, y analizadas por citometría de flujo. Las células muertas fueron identificadas a partir de la medición de la dispersión frontal y lateral, y de la incorporación de PI. Las células con

niveles de dispersión fuera del rango característico de las células vivas y marcadas además con PI, fueron contadas como células muertas.

A diferencia del mAb 14F7, que produjo muerte celular solo en la línea L1210 nativa, el anticuerpo 7C1 con especificidad dual produjo un marcado efecto de muerte celular tanto en la línea L1210 nativa (Figura 3A) como en la línea transformada L1210-SH que expresa N-acetil GM3 (Figura 3B). Es de destacar el fuerte efecto de muerte celular (95%) producido por el mAb 7C1 en la línea L1210 nativa, mayor que el efecto producido por el mAb 14F7hT (54%), lo cual demuestra que el anticuerpo 7C1 tiene un efecto citotóxico superior en células con una sobre-expresión mixta de los gangliósidos N-acetil y N-glicolil GM3. La Figura 3C resume los resultados de estos experimentos.

Ejemplo 4. Reconocimiento por el mAb 7C1 de células normales, sin producir muerte celular.

El anticuerpo 7C1, que tiene un fuerte efecto citotóxico en células tumorales, no produce sin embargo muerte celular en células normales que expresan N-glicolil o N-acetil GM3, como demuestran los experimentos realizados con esplenocitos de ratones Balb/c.

En experimentos de reconocimiento celular por citometría de flujo, los linfocitos B de ratón Balb/c fueron doblemente marcados con un anticuerpo policlonal anti-B220 (Dako, dilución 1:200), y con el anticuerpo 7C1 (a una concentración de 10 microgramos/mililitro). Los ensayos de viabilidad celular fueron realizados con linfocitos B provenientes de bazo de ratones Balb/c, incubados con el anticuerpo 7C1. Un millón de linfocitos B purificados con perlas magnéticas (Myltecni Biotec) fueron incubaron con 50 microgramos de anticuerpo disuelto en medio DMEM-F12 suplementado con BSA 1%, por 3 horas a 37°C en atmósfera de CO₂. La muerte inducida por el tratamiento se determinó por incorporación de yoduro de propidio. Tanto en los experimentos de reconocimiento celular como en los de viabilidad celular, se utilizó el anticuerpo humanizado C5Q como control irrelevante.

Como se muestra en la Figura 4A, el mAb 7C1 produjo un notable marcaje de los linfocitos B de ratón Balb/c, así como de otros esplenocitos. No obstante el marcado reconocimiento de estas células por el mAb 7C1, los ensayos de viabilidad celular realizados con linfocitos B purificados demostraron que el anticuerpo 7C1 no tiene efecto citotóxico sobre los linfocitos B normales, como se muestra en la Figura 4B.

Tabla 1. Secuencias de las regiones hipervariables (CDRs) de cadena pesada de fragmentos scFv extraídos de la biblioteca de fagos, que tienen especificidad dual por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3.

Clon de scFv	CDR H1 *	CDR H2	CDR H3
14F7 original (anti NeuGc- GM3)	GYSFTSYWIH	YIDPATAYTESNQKFKD	ESPRLRRGIYYYAMD Y
1	-- R-R —Q--	-----	-----
2	---- R-Q --	--N---S-----	-----
3	-- R ---NQ--	F-----	-----
4	---NR-Q--	D--GR-----	-----
5	--- RR-Q --	-----N-----	-----
6	---I- R-Q --	--N---S-----	---F-----
7	---K--Q--	F-N-----	-----
8	---- R-Q --	-----N-----	-----
9	---- R-Q --	F---S---V-----	-----
10	-----Q--	--N---S-----	-----
11	---- R-Q --	-----K-----	-----
12	---- R-Q --	-----	-----R-----
13	---- R-Q --	--N-GS-----	---M-----
14	-- R-R ----	-L--N-----	---V-----
15	-- R — R ----	-V--N-----	---V-----
16	---- R-Q --	--N-----	-----
17	---NR-Q--	-----W-----	-----
18	--T— R-Q --	---G-----	-----
19	--P— R-Q --	---R-----	-----L-----
20	---SR-QV-	-V---H-----	-----L-----
21	--H---Q--	--N-----	-----
22	---- R-Q --	--N-----D-----	-----L-----

* El CDR H1 en la tabla incluye las posiciones 26-35 de la región VH, según (Chothia & Lesk, J Mol Biol 196:901-17, 1987). Las rayas en las secuencias de los diferentes clones representan identidad con el aminoácido correspondiente en la secuencia del mAb 14F7. Las mutaciones más frecuentes están señaladas con letras en negrita.

Tabla 2. Efecto de diferentes sustituciones de aminoácidos scFv realizadas en un conjunto de posiciones de la región VH, en la unión de los fragmentos a NeuAc-GM3 y NeuGc-GM3.

Posición	Aminoácido original	Sustituciones compatibles con especificidad dual *	Sustituciones con efecto negativo en la unión a NeuAc-GM3 / NeuGc-GM3
33	W	Q	C, E, G, H, K, N, P, R, S, T
52	D	A, E, N, S, T	C, F, H, K, P, R, V, Y
53	A	D, E, G, H, L, S, T, Y	C
98	R	R	A, E, G, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y
100-100A	RR	AK, HR, TR	GC, LD, PA, TD, AL, DR, LS, PQ, PT, TP, WP
100B	G	A, D, F, L, Q, R, S	C
100D	Y	F	D, G, H, K, L, P, Q, R, S, T, V

* Las sustituciones que resultaron compatibles con la especificidad dual fueron realizadas sobre la secuencia del mutante RRQ (las tres letras representan los aminoácidos presentes en las posiciones 28, 30 y 33, respectivamente).

10

15

-

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-gangliósidos caracterizado porque tiene especificidad dual y alta afinidad por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3.
- 5 2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, caracterizado porque la región variable de la cadena pesada contiene los siguientes CDRs:
 - CDR-H1: GYRFRSYQIH, sec. con núm. de ident: 3
 - CDR-H2: YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17
 - 10 CDR-H3: ESPRLRRGIYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 caracterizado porque la secuencia de la región variable de la cadena pesada es la sec. con núm. de ident: 1, QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYRFRSYQIHWLKQRPDQGLEWIGYIDP
 - 15 ATAYTESNQKFKDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESPRLRRGIY
 - YYAMDYWGQGTSTVTVSS
4. El anticuerpo según la reivindicación 1 caracterizado porque la secuencia de la CDR-H1 se selecciona del grupo que consiste de:
 - 20 CDR-H1 GYRFRSYQIH, sec. con núm. de ident: 3
 - CDR-H1 GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 4
 - CDR-H1 GYRFTSNQIH, sec. con núm. de ident: 5
 - CDR-H1 GYSFNRYQIH, sec. con núm. de ident: 6
 - CDR-H1 GYSFRRYQIH, sec. con núm. de ident: 7
 - 25 CDR-H1 GYSITRYQIH, sec. con núm. de ident: 8
 - CDR-H1 GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 9
 - CDR-H1 GYSFKSYQIH, sec. con núm. de ident: 10
 - CDR-H1 GYSFTSYQIH, sec. con núm. de ident: 11
 - CDR-H1 GYRFTRYWIH, sec. con núm. de ident: 12
 - 30 CDR-H1 GYTFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 13
 - CDR-H1 GYPFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 14
 - CDR-H1 GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
 - CDR-H1 GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16
- 35 5. El anticuerpo según la reivindicación 1 caracterizado porque la secuencia de la CDR-H2 se selecciona del grupo que consiste de:

	CDR-H2	YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17
	CDR-H2	YINPATASTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 18
	CDR-H2	FIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 19
	CDR-H2	DIDPGRAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 20
5	CDR-H2	YIDPATANTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 21
	CDR-H2	FINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 22
	CDR-H2	FIDPASAYTVSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 23
	CDR-H2	YIDPATAKTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 24
	CDR-H2	YINPGSAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 25
10	CDR-H2	YLDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 26
	CDR-H2	YVDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 27
	CDR-H2	YINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 28
	CDR-H2	YIDPATAWTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 29
	CDR-H2	YIDPGTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 30
15	CDR-H2	YIDPRTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 31
	CDR-H2	YVDPATAHTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 32
	CDR-H2	YINPATAYTDSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 33

6. El anticuerpo según la reivindicación 1 caracterizado porque la secuencia de la CDR-H3 se selecciona del grupo que consiste de:

20	CDR-H3	ESPRLLRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
	CDR-H3	ESPRFRGRYYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
	CDR-H3	ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
	CDR-H3	ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
	CDR-H3	ESPRLLRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

25

7. Un anticuerpo monoclonal anti-gangliósidos caracterizado porque tiene especificidad dual y alta afinidad por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3 caracterizado porque comprende cualquier combinación de secuencias de las CDRs H1, H2 y H3 del grupo que consiste de:

30	CDR-H1	GYRFRSYQIH, sec. con núm. de ident: 3
	CDR-H1	GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 4
	CDR-H1	GYRFTSNQIH, sec. con núm. de ident: 5
	CDR-H1	GYSFNRYQIH, sec. con núm. de ident: 6
	CDR-H1	GYSFRRYQIH, sec. con núm. de ident: 7
35	CDR-H1	GYSITRYQIH, sec. con núm. de ident: 8
	CDR-H1	GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 9
	CDR-H1	GYSFKSYQIH, sec. con núm. de ident: 10
	CDR-H1	GYSFTSYQIH, sec. con núm. de ident: 11

5	CDR-H1	GYRFTRYWIH, sec. con núm. de ident: 12
	CDR-H1	GYTFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 13
	CDR-H1	GYPFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 14
	CDR-H1	GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
	CDR-H1	GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16
10	CDR-H2	YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17
	CDR-H2	YINPATASTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 18
	CDR-H2	FIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 19
	CDR-H2	DIDPGRAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 20
	CDR-H2	YIDPATANTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 21
	CDR-H2	FINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 22
	CDR-H2	FIDPASAYTVSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 23
	CDR-H2	YIDPATAKTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 24
15	CDR-H2	YINPGSAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 25
	CDR-H2	YLDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 26
	CDR-H2	YVDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 27
	CDR-H2	YINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 28
	CDR-H2	YIDPATAWTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 29
20	CDR-H2	YIDPGTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 30
	CDR-H2	YIDPRTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 31
	CDR-H2	YVDPATAHTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 32
	CDR-H2	YINPATAYTDSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 33
25	CDR-H3	ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
	CDR-H3	ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
	CDR-H3	ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
	CDR-H3	ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
	CDR-H3	ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

30

8. El anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque la secuencia de la región variable de la cadena ligera es: sec. con núm. de ident: 2:

DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSCRASQSSISNNLHWYQQRTHESPRLLIKYYASQSSIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFCQQSNRWPLTFGAGTKLELKRA

35

El anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque la secuencia de la región variable de la cadena ligera es cualquier secuencia de región variable de cadena ligera de un anticuerpo.

5 9. El anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque la secuencia de la región variable de la cadena ligera es cualquier secuencia de región variable de cadena ligera de un anticuerpo humano.

10 10. El anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque la secuencia de la región variable de la cadena ligera es cualquier secuencia de región variable de cadena ligera de un anticuerpo humanizado.

11. El anticuerpo de la reivindicación 2, caracterizado porque la secuencia del CDR-H2 y/o la secuencia del CDR-H3 contienen al menos una de las sustituciones de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

15	CDR-H2	Asp 52 sustituida por Ala, Glu, Asn, Ser o Thr
	CDR-H2	Ala 53 sustituida por Asp, Glu, Gly, His, Leu, Ser, Thr o Tyr
	CDR-H3	Arg 100-Arg 100A sustituidas por Ala-Lys, His-Arg o Thr-Arg
	CDR-H3	Gly 100B sustituida por Ala, Asp, Phe, Leu, Gln, Arg o Ser
20	CDR-H3	Tyr 100 D sustituida por Phe

12. Un fragmento derivado del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

13. El fragmento según la reivindicación 13 caracterizado por:
25 una secuencia de la CDR-H1 que se selecciona del grupo que consiste de:

	CDR-H1	GYRFRSYQIH, sec. con núm. de ident: 3
	CDR-H1	GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 4
	CDR-H1	GYRFTSNQIH, sec. con núm. de ident: 5
	CDR-H1	GYSFNRYQIH, sec. con núm. de ident: 6
30	CDR-H1	GYSFRRYQIH, sec. con núm. de ident: 7
	CDR-H1	GYSITRYQIH, sec. con núm. de ident: 8
	CDR-H1	GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 9
	CDR-H1	GYSFKSYQIH, sec. con núm. de ident: 10
	CDR-H1	GYSFTSYQIH, sec. con núm. de ident: 11
35	CDR-H1	GYRFTRYWIH, sec. con núm. de ident: 12
	CDR-H1	GYTFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 13
	CDR-H1	GYPFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 14

	CDR-H1	GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
	CDR-H1	GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16
	una secuencia de la CDR-H2 que se selecciona del grupo que consiste de:	
	CDR-H2	YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17
5	CDR-H2	YINPATASTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 18
	CDR-H2	FIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 19
	CDR-H2	DIDPGRAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 20
	CDR-H2	YIDPATANTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 21
	CDR-H2	FINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 22
10	CDR-H2	FIDPASAYTVSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 23
	CDR-H2	YIDPATAKTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 24
	CDR-H2	YINPGSAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 25
	CDR-H2	YLDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 26
	CDR-H2	YVDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 27
15	CDR-H2	YINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 28
	CDR-H2	YIDPATAWTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 29
	CDR-H2	YIDPGTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 30
	CDR-H2	YIDPRTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 31
	CDR-H2	YVDPATAHTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 32
20	CDR-H2	YINPATAYTDSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 33
	una secuencia de la CDR-H3 que se selecciona del grupo que consiste de:	
	CDR-H3	ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
	CDR-H3	ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
	CDR-H3	ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
25	CDR-H3	ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
	CDR-H3	ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

14. El fragmento según la reivindicación 13 caracterizado porque comprende cualquier combinación de secuencias de las CDRs H1, H2 y H3 del grupo que consiste de:

30	CDR-H1	GYRFRSYQIH, sec. con núm. de ident: 3
	CDR-H1	GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 4
	CDR-H1	GYRFTSNQIH, sec. con núm. de ident: 5
	CDR-H1	GYSFNRYQIH, sec. con núm. de ident: 6
35	CDR-H1	GYSFRRYQIH, sec. con núm. de ident: 7
	CDR-H1	GYSITRYQIH, sec. con núm. de ident: 8
	CDR-H1	GYSFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 9

5	CDR-H1	GYSFKSYQIH, sec. con núm. de ident: 10
	CDR-H1	GYSFTSYQIH, sec. con núm. de ident: 11
	CDR-H1	GYRFTRYWIH, sec. con núm. de ident: 12
	CDR-H1	GYTFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 13
	CDR-H1	GYPFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 14
	CDR-H1	GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
	CDR-H1	GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16
10	CDR-H2	YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17
	CDR-H2	YINPATASTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 18
	CDR-H2	FIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 19
	CDR-H2	DIDPGRAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 20
	CDR-H2	YIDPATANTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 21
	CDR-H2	FINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 22
	CDR-H2	FIDPASAYTVSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 23
15	CDR-H2	YIDPATAKTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 24
	CDR-H2	YINPGSAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 25
	CDR-H2	YLDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 26
	CDR-H2	YVDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 27
	CDR-H2	YINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 28
	CDR-H2	YIDPATAWTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 29
	CDR-H2	YIDPGTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 30
20	CDR-H2	YIDPRTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 31
	CDR-H2	YVDPATAHTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 32
	CDR-H2	YINPATAYTDSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 33
	CDR-H3	ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
	CDR-H3	ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
	CDR-H3	ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
	CDR-H3	ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
30	CDR-H3	ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

15. Un fragmento según la reivindicación 14 o 15 caracterizado porque es un fragmento de tipo Fab.

16. Un fragmento según la reivindicación 14 o 15 caracterizado porque es un fragmento de tipo Fab'.
- 5 17. Un fragmento según la reivindicación 14 o 15 caracterizado porque es un fragmento de tipo (Fab)₂.
18. Un fragmento según la reivindicación 14 o 15 caracterizado porque es un fragmento de tipo scFv.
- 10 19. Una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos que expresen los gangliósidos N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3, caracterizada porque comprende cualquiera de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 12 o los fragmentos derivados de éstos y un vehículo farmacéuticamente estable.
- 15 20. Un método de tratamiento de tumores malignos que expresen los gangliósidos N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3, caracterizado porque comprende la administración de la composición farmacéutica de la reivindicación 20 a un sujeto que lo necesite.
- 20 21. El método de la reivindicación 21 donde el sujeto es humano.
22. Un juego de reactivos para el diagnóstico de enfermedades que expresen los gangliósidos N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3, caracterizado porque comprende cualquiera de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 12 o los fragmentos derivados de éstos.
- 25
- 30



- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/30 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2013/000001
- (22) Fecha de presentación internacional:
21 de febrero de 2013 (21.02.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
CU/P/2012-0035
1 de marzo de 2012 (01.03.2012) CU
- (71) Solicitante: **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR** [CU/CU]; Calle 216 Esq. a 15, Atabey. Playa., La Habana 11600 (CU).
- (72) Inventores: **MORENO FRIAS, Ernesto**; Calle 174 edif BBE1 apart 16 entre Ira y 5ta, Playa, La Habana 11600 (CU). **ROJAS DORANTES, Gertrudis**; Santa Irene No 164 entre Flores y San Benigno, Santos Suárez., La Habana 10500 (CU). **CASADESUS PAZOS, Ana Victoria**; Santa Isabel No. 264 entre Santa Amalia y Arnao, Arroyo Naranjo., La Habana 10900 (CU).
- (74) Mandatario: **LÓPEZ MATILLA, Lien**; Calle 216 Esq. a 15, Atabey. Playa., La Habana 11600 (CU).
- (81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

(54) Title: RECOMBINANT ANTIBODIES HAVING DUAL SPECIFICITY FOR GANGLIOSIDES AND USE THEREOF

(54) Título : ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON ESPECIFICIDAD DUAL POR GANGLIÓSIDOS Y SU USO

(57) Abstract: The present invention relates to novel monoclonal antibodies and fragments of said antibodies, which have dual specificity and a high affinity for the gangliosides N-acetyl GM3 and N-glycolyl GM3, and which do not recognize other gangliosides. According to another aspect, the present invention relates to the use of said antibodies and the fragments thereof in tumor therapy, in which said tumors have a significant expression of any of the two antigens recognized by said antibodies, or a mixed expression of both antigens. The invention also relates to a use of said antibodies in the diagnosis of tumors that express at least one of the antigens.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con nuevos anticuerpos monoclonales y fragmentos de estos anticuerpos, con especificidad dual y alta afinidad por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3, y que no reconocen otros gangliósidos. En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de estos anticuerpos y sus fragmentos en la terapia de tumores que tienen una expresión significativa de cualquiera de los dos antígenos reconocidos por estos anticuerpos, o una expresión mixta de ambos antígenos. Así como al uso de estos anticuerpos en el diagnóstico de tumores que expresen al menos uno de los antígenos.



P A T E N T E S

CESION

El (los) suscrito (s)

MORENO FRIAS, Ernesto;
ROJAS DORANTES, Gertrudis;
CASADESUS PAZOS, Ana Victoria.

en consideración al pago de la suma de
(.....), que he(mos) recibido, por el presente documento cedo (cedemos) a
CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

una compañía constituida de conformidad con las leyes de CUBA

con oficinas en Calle 216 Esq. a 15, Atabey, Playa, La Habana 11600, CUBA

todos los derechos y títulos sobre la invención denominada

ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON ESPECIFICIDAD DUAL POR GANGLIOSIDOS Y SU USO

EL CESIONARIO firma también el presente y declara que acepta dicha cesión

Dado y firmado hoy

en *La Habana 8 de Agosto de 2014.*

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

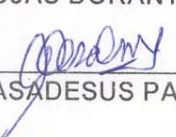
CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
castellanos@castellanosyco.co

P A T E N T E S

Inventores


MORENO FRIAS, Ernesto


ROJAS DORANTES, Gertrudis


CASADESUS PAZOS, Ana Victoria

Cesionario


Agustín Lage Dávila
Director General
Centro de Inmunología Molecular

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
castellanos@castellanosyco.co

FIGURA 1

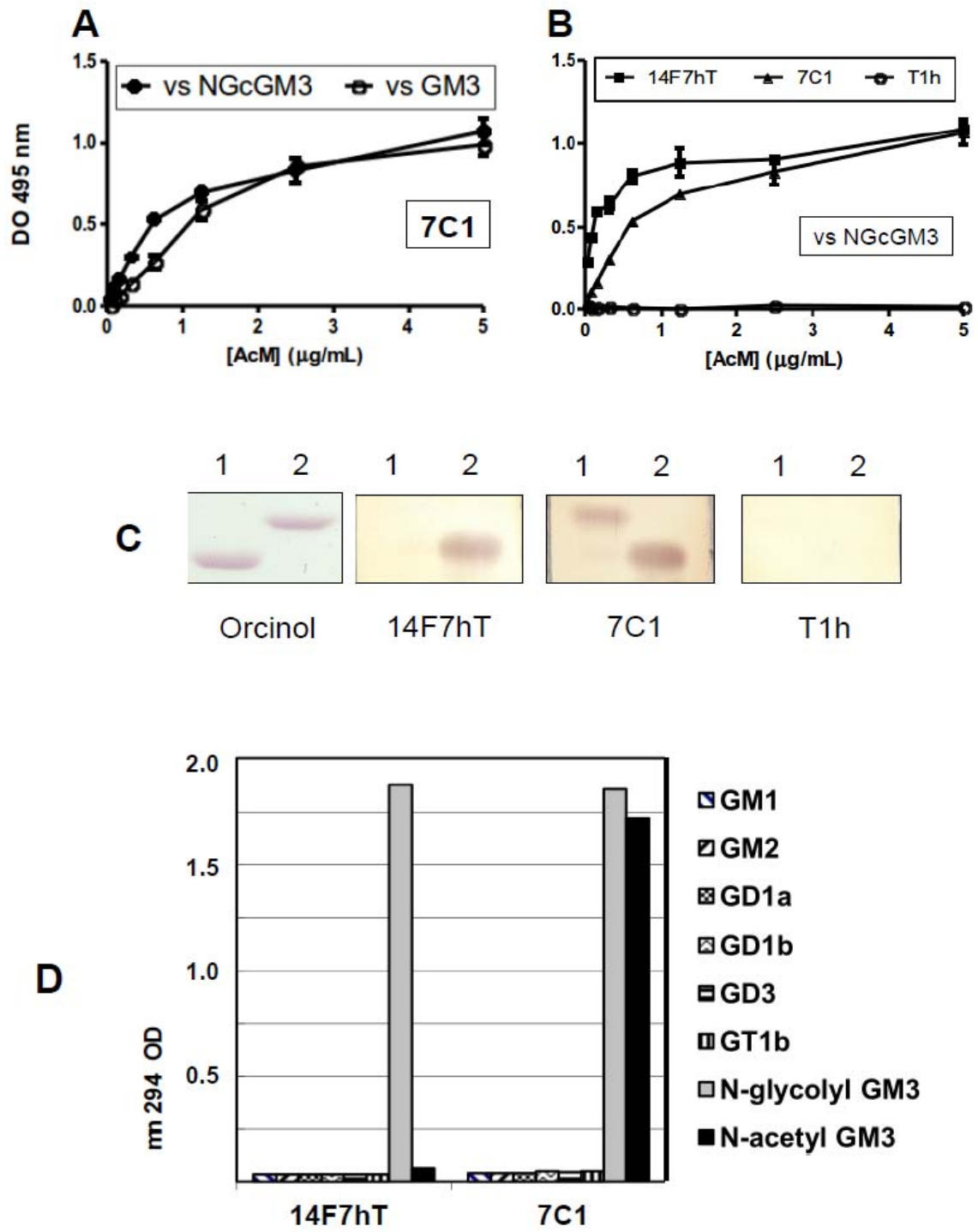
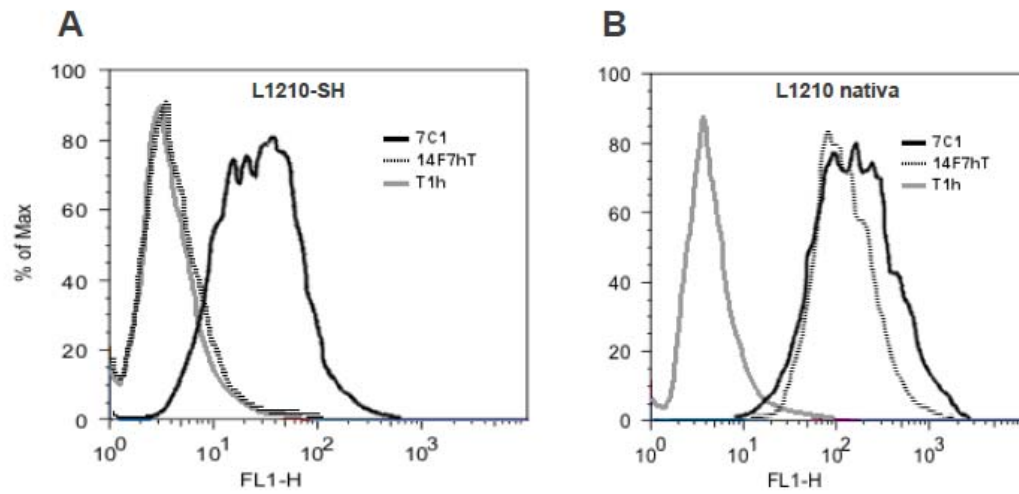
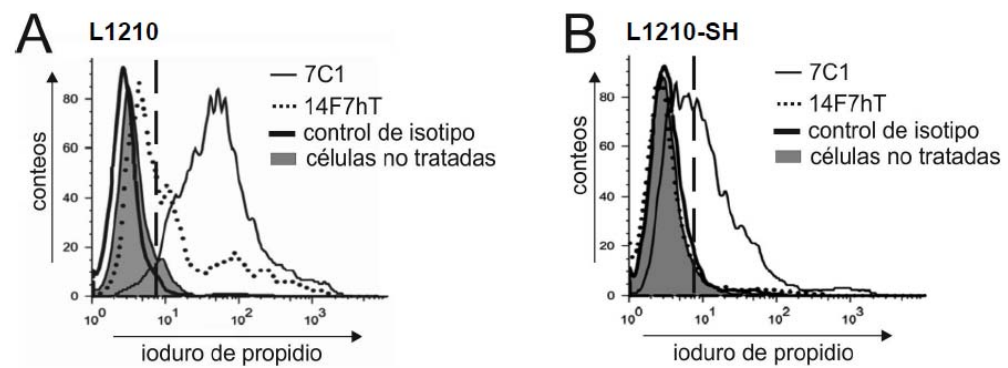
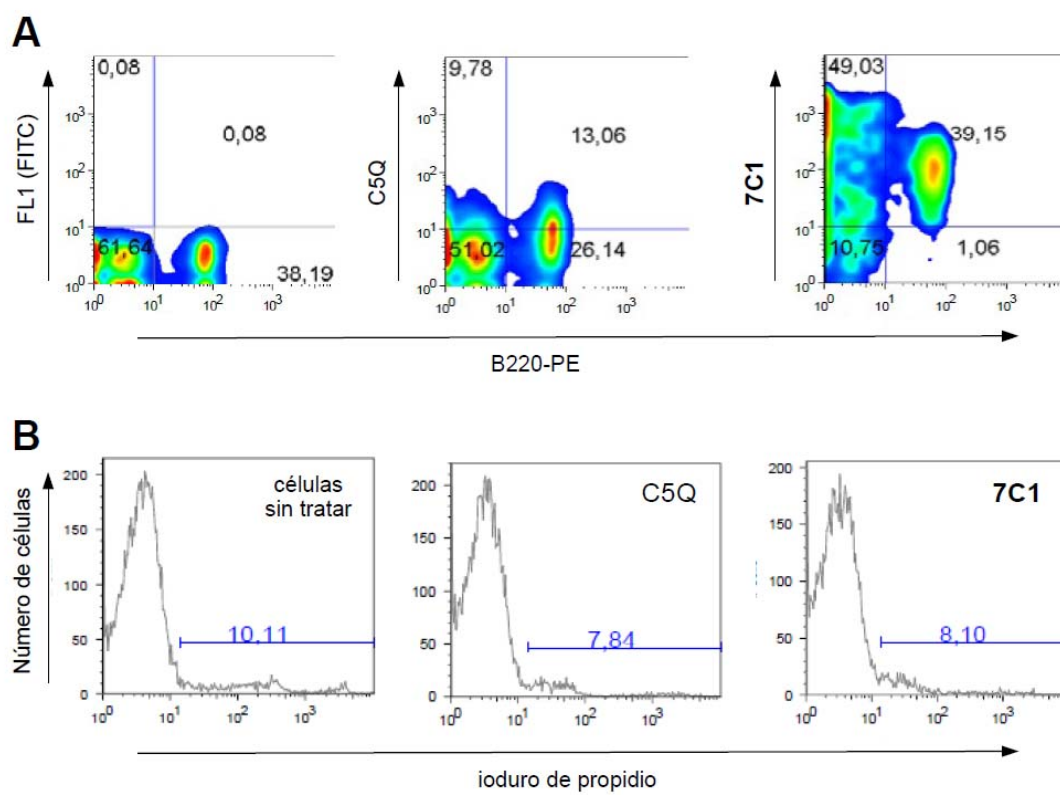


FIGURA 2**FIGURA 3**

C	Línea celular	Porcentaje de muerte celular (incorporación de PI)			
		Células no tratadas	T1h (control de isotipo)	14F7hT	7C1
	L1210	13	6	50	95
	L1210-SH	9	10	13	54

FIGURA 4



PODER

El (los)

CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

Domiciliados en

Calle 216 Esq 15Atabey, Playa La Habana 11600, Cuba

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso – administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- b) Para la obtención de registros sanitarios;
- c) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- d) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

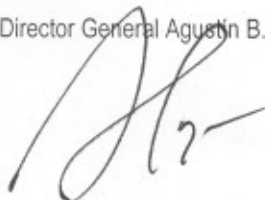
Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 05 de diciembre de 2012

En la Habana.

Por el Director General Agustín B. Lage Davila.



CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.co

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

Of

Calle 216 Esq 15Atabey, Playa La Habana 11600, Cuba

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia,

obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for

which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- b) For the obtainment of Sanitary registrations;
- c) For the obtainment of copyright registrations
- d) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this

in

by

LISTADO DE SECUENCIAS
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLCULAR

<120> ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON ESPECIFICIDAD DUAL POR GANGLIÓSIDOS Y SU USO

<130> RECOMBINANT ANTIBODIES WITH DUAL SPECIFICITY FOR GANGLIOSIDES AND THEIR USE

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asn Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Met Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Arg Ser Tyr
20 25 30

Gln Ile His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Phe
65 70 75 80

Met Tyr Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Pro Arg Leu Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 2

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

LISTADO DE SECUENCIAS

Asp Ser Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ile Ser Val Glu Thr
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Arg Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
100 105

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 3

Gly Tyr Arg Phe Arg Ser Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 4

Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 5

Gly Tyr Arg Phe Thr Ser Asn Gln Ile His
1 5 10

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 6

LISTADO DE SECUENCIAS

Gly Tyr Ser Phe Asn Arg Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 7

Gly Tyr Ser Phe Arg Arg Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 8

Gly Tyr Ser Ile Thr Arg Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 9

Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 10

Gly Tyr Ser Phe Lys Ser Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 11

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT

LISTADO DE SECUENCIAS

<213> recombinante

<400> 12

Gly Tyr Arg Phe Thr Arg Tyr Trp Ile His
1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 14

Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 15

Gly Tyr Ser Phe Ser Arg Tyr Gln Ile Val
1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 16

Gly Tyr His Phe Thr Arg Tyr Gln Ile His
1 5 10

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 17

Tyr Ile Asp Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

LISTADO DE SECUENCIAS

Asp

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> recombinante

<400> 18

Tyr Ile Asn Pro Ala Thr Ala Ser Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> recombinante

<400> 19

Phe Ile Asp Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> recombinante

<400> 20

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

Asp

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> recombinante

<400> 21

Tyr Ile Asp Pro Ala Thr Ala Asn Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

LISTADO DE SECUENCIAS

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> recombinante

<400> 22

Phe Ile Asn Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> recombinante

<400> 23

Phe Ile Asp Pro Ala Ser Ala Tyr Thr Val Ser Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> recombinante

<400> 24

Tyr Ile Asp Pro Ala Thr Ala Lys Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> recombinante

<400> 25

Tyr Ile Asn Pro Gly Ser Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asp

<210> 26
 <211> 17

LISTADO DE SECUENCIAS

<212> PRT
<213> recombinante

<400> 26

Tyr Leu Asp Pro Ala Asn Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 27

Tyr Val Asp Pro Ala Asn Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 28

Tyr Ile Asn Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 29

Tyr Ile Asp Pro Ala Thr Ala Trp Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> recombinante

LISTADO DE SECUENCIAS

<400> 30

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

Asp

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 31

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

Asp

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 32

Tyr Val Asp Pro Ala Thr Ala His Thr Glu Ser Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 33

Tyr Ile Asn Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Asp Ser Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> recombinante

<400> 34

Glu Ser Pro Arg Leu Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

LISTADO DE SECUENCIAS
10

1 5 15

<210> 35
<211> 16
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 35

Glu Ser Pro Arg Phe Arg Arg Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 36

Glu Ser Pro Arg Met Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 37
<211> 16
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 37

Glu Ser Pro Arg Val Arg Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 38
<211> 16
<212> PRT
<213> recombinante

<400> 38

Glu Ser Pro Arg Leu Arg Arg Gly Leu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

RESUMEN

La presente invención se relaciona con nuevos anticuerpos monoclonales y fragmentos de estos anticuerpos, con especificidad dual y alta afinidad por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3, y que no reconocen otros gangliósidos. En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de estos anticuerpos y sus fragmentos en la terapia de tumores que tienen una expresión significativa de cualquiera de los dos antígenos reconocidos por estos anticuerpos, o una expresión mixta de ambos antígenos. Así como al uso de estos anticuerpos en el diagnóstico de tumores que expresen al menos uno de los antígenos.

10

15

20