



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 584**

51 Int. Cl.:
C07K 16/42 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98952503 .5**
86 Fecha de presentación : **21.10.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **1027375**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2000**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos, su uso en inmunoterapia activa de tumores malignos y composiciones que contienen los mismos.**

30 Prioridad: **21.10.1997 CU 119/97**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

73 Titular/es: **Centro de Inmunología Molecular
c/ 216 y 15, Atabey, Playa
Ciudad de la Habana 12100, CU**

72 Inventor/es: **Vasquez Lopez, Ana Maria;
Perez Rodriguez, Rolando;
Iglesias Sierra, Eladio;
Perez Gonzalez, Alexis;
Bombino Lopez, Gumersinda y
Beausoleil Delgado, Irene**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 274 584 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

Anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos, su uso en inmunoterapia activa de tumores malignos y composiciones que contienen los mismos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere de forma general a anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos y su uso como inmunomoduladores. Más particularmente, la presente invención implica un anticuerpo monoclonal murino que fue desarrollado contra un anticuerpo monoclonal murino reactivo con gangliósidos que contienen N-glicolil y con antígenos expresados en células de cáncer; y su efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral.

Antecedentes

15 Una de las estrategias para el tratamiento del cáncer ha sido el uso de inmunoterapia activa, una modalidad de tratamiento que tiene el objetivo de activar el potencial natural del sistema inmunológico del huésped contra el tumor.

Desde que Niels Jerne propusiera su teoría de la red idiotípica en 1974 (Jerne, N. K. 1974. *Ann. Immunol.* **125C**, 373-389), han surgido nuevas posibilidades en el estudio de terapias eficaces contra el cáncer. La teoría de Jerne presentaba, por primera vez, el sistema inmunológico como una red de anticuerpos que pueden interactuar entre sí y con un gran número de epítomos naturales, a través de sus regiones variables o idiotipos. (Id).

Este complejo grupo de interacciones idiotipo-anti-idiotipo funciona para regular las respuestas inmunes frente a antígenos. Los anticuerpos hechos en respuesta al antígeno original, llamados Ab1, se vuelven ellos mismos antígenos y generan la producción de un segundo grupo de anticuerpos, llamados anticuerpos anti-idiotipo (anti-Id) o Ab2, que también pueden ser regulados por otros anticuerpos que son denominados anti-anti-idiotipo (Ab1' o Ab3).

La teoría original de Jerne sigue siendo revisada y se ha mencionado que el resultado de la interacción de Ab2 con linfocitos que llevan Ab1 no tiene que ser la supresión necesariamente de la respuesta inmune, pero puede ser la estimulación de esta respuesta. Además, Jerne limitó su teoría a los linfocitos B y a los anticuerpos, pero está ahora claro que las células T juegan un importante papel en la regulación a través de los idiotipos de receptores de células T (Teitelbaum, D. *et al.* 1984 *J. Immunol.* **132**, 1282-1285; Zanetti, M, *et al.* (1986) *J. Immunol.* **137**, 3140-3196; Powell, J. *et al.* (1988) **140**, 3266-3272; Baskin, J. G. *et al.* (1990) *J. Immunol.* **145**, 202-208; Furuyama, A. *et al.* (1992) *Anticancer. Res.* **12**, 27-32; Raychaudhuri, S. *et al.* *J. Immunol.* **131**, 271-278; Raychaudhuri *et al.* (1987) *J. Immunol.* **139**, 3902-3910, Durrant *et al.* (1994) *Cancer. Res.* **54**, 4837-4840).

Un idiotipo se define inmunológicamente por la reactividad con más de un anti-Id que reconoce a un determinante idiotípico o idiotopo dentro de un idiotipo dado. Así, cuando un Ab1 particular expresa múltiples idiotipos, cuando este Ab1 se administra a animales singéncicos, es obtenida una población heterogénea de anticuerpos anti-Id.

La clasificación de los anticuerpos anti-Id se basa en su unión dentro del sitio de unión del antígeno o a alguna otra región del idiotipo. Si la unión del Ab2 con el Ab1 es inhibida por el antígeno relevante y si el Ab2 es también capaz de inducir una respuesta del anticuerpo de la misma especificidad que el Ab1, éste imita al antígeno natural y es clasificado como Ab2 β ; este tipo de Ab2 se denomina anti-idiotipo de imagen interna y pueden actuar como antígenos sustitutos. Los anti-Id que no son inhibidos por el antígeno son designados Ab2 α , estos Ab2 reaccionan con idiotipos de Ab1 que estructuralmente no están emparentados con el sitio de unión al antígeno.

En 1984, Bona y Köhler propusieron un tercer tipo de anticuerpos anti-Id (Ab2 γ), que se inhiben por el antígeno debido a interferencias estéricas, este tipo de anti-Id reacciona con idiotipos estructuralmente asociados con el sitio de unión del antígeno, pero no imitan al epítomo antigénico reconocido por el Ab1 (Bona y Köhler (1984) *Anti-idiotypic antibodies and internal image*. En "Monoclonal and anti-idiotypic antibodies: Probes for receptor structure and function", Venter J.C., Frasser, C.M., Lindstrom, J. (Eds.) Nueva York, Alan R. Lises, págs. 141-149, 1984).

Basado en la teoría de Jerne, dos logros principales han sido desarrollados en el desarrollo de vacunas para un gran número de antígenos, incluyendo antígenos asociados a tumores. El primer enfoque está basado en la presentación de epítomos en un ambiente molecular diferente, usando Ab2 β . Las vacunas que contienen este tipo de anticuerpos anti-Id han sido capaces de inducir respuestas protectoras contra virus, bacterias, y parásitos (Kennedy *et al.* (1986) **232**, 220-223; 1047; McNamara *et al.* (1985) *Science* **226**, 1325-1326). Los Ab2 β también han sido usados para inducir respuestas inmunes frente a antígenos asociados a tumores y han sido obtenidos resultados positivos en modelos de animal y en ensayos clínicos (Raychaudhuri *et al.* (1986) *J. Immunol.* **137**, 1743-1749; Raychaudhuri *et al.* (1987) *J. Immunol.* **139**, 3902-3910; Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1987) *J. Immunol.* **139**, 1354-1360; Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1988) *J. Immunol.* **141**, 1398-1403; Herlyn, D. *et al.* (1989) *Intern. Rev. Immunol.* **4**, 347-357; Chen, Z-J *et al.* *Cell Imm. Immunother. Cancer* (1990) 351-359; Herlyn, D. *et al.* (1991) *In Vivo* **5**, 615-624; Furuya *et al.* (1992) *Anticancer. Res.* **12**, 27-32; Mittelman, A. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **89**, 466-470; Durrant, L. G. *et al.* (1994) *Cancer. Res.* **54**, 4837-4840; Mittelman, A. *et al.* (1994) *Cancer. Res.* **54**, 415-421; Schmitt, H. *et al.* (1994) *Hybridoma* **13**, 389-396; Chakrobarty, M. *et al.* (1995) *J. Immunother.* **18**, 95-103; Chakrobarty, M. *et al.* (1995) *Cancer. Res.* **55**, 1525-1530; Foon, K. A. *et al.* (1995) *Clin. Cancer. Res.* **1**, 1205-1294; Herlyn, D, *et al.* (1995) *Hybridoma* **14**, 159-166; Sclebusch, H. *et al.* (1995) *Hybridoma* **14**, 167-174; Herlyn, D. *et al.* (1996) *Cancer*

Immunol. Immunother. **43**, 65-76). Sin embargo, ha sido demostrado que el carácter β de un Ab2 no es suficiente para predecir el efecto biológico que podría inducir el Ab2 (Raychaurhuri *et al.* (1986) *J. Immunol.* **137**, 1743-1749; Raychaurhuri *et al.* (1987) *J. Immunol* **139**, 231-278; Maruyama *et al.* (1996) *Int. J. Cancer* **65**, 547-553).

5 El segundo enfoque está basado en la manipulación de la red a través de idiotopos reguladores, que no están asociados a la unión del antígeno, pero que implican idiotopos compartidos con otros anticuerpos o células T. Se han acumulado pruebas de que estos anticuerpos anti-Id son también capaces de producir respuestas inmunes y efectos protectores (Paul, W. E. y Bona, C. (1982) *Immunology Today* **3**, 230-234; McNamara M. K. *et al.* (1985) *Science* **226**, 1325-1326; Köhler y col. (1992) *Proc. 8º Inter. Cong. Immunol.* Budapest, págs. 619).

10 Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico y que se expresan en la mayoría de las membranas de células de mamíferos. Aunque estos antígenos estén presentes en los tejidos normales, pueden ser encontrados en cantidades más grandes y expresarse en una organización y conformación diferentes sobre la superficie de células malignas (Hakomori, S. (1985), *Cancer. Res.* **45**, 2405-2415; Miraldi, F. (1989) *XIX Seminarios en Medicina Nuclear*, 282-294; Hamilton *et al.* (1993) *Int. J. Cancer* **53**, 1-81).

Aunque los gangliósidos sean objetivos útiles para las respuestas inmunes, su inmunogenicidad es extremadamente pobre, debido a su naturaleza de carbohidrato y a su condición de autoantígeno (Livingston, P. *et al.*, (1995) *6º Seminario en Biología del Cáncer*, 357-366).

20 La variante de N-glicolil del ácido siálico se expresa en los tejidos normales de la mayor parte de mamíferos, pero es muy difícil detectarla en tejidos normales de humanos (Watarai, S. *et al.* (1995) *J. Biochem.* **117**, 1062-1069). Por otra parte, la presencia de estos antígenos ha sido publicada en el cáncer de colon, melanoma, retinoblastoma y cáncer de mama, entre otros (Higachi, H. *et al.* (1984) *Jpn. J. Cancer. Res. (Gann)* **75**, 1025-1029; Higachi, H. *et al.* (1985) *Cancer. Res.* **45**, 3796-3802; Hirabayashi, I *et al.* (1987) *Jpn. J. Cancer. Res. (Gann)* **78**, 1614-1620, Higachi, H. *et al.* (1980) *Jpn. J. Cancer. Res. (Gann)* **79**, 952-956, Miyake, M. *et al.* (1990) *Cancer* **65**, 499-505; Devine, P. L. *et al.* (1991) *Cancer. Res.* **51**, 5826-5306; Vázquez, A. M. *et al.* (1995) *Hybridoma* **14**, 551-556; Marquina, G. *et al.* (1996) *Cancer. Res.* **56**, 5165-5171).

30 La inmunización con vacunas que contienen gangliósidos ha causado una supervivencia prolongada de pacientes de melanoma que desarrollaron anticuerpos anti-gangliósido (Livingston, P. *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2911-2915, Livingston, P. *et al.* (1989) *Cancer. Res.* **49**, 7045-7050; Livingston, P. (1995) *Immunological Reviews* **145**, 147-166). Sin embargo, los problemas de los antígenos, juntos con su pobre inmunogenicidad, han hecho del uso de los anticuerpos anti-Id una alternativa atractiva para la inmunoterapia activa en este modelo antígeno. Un anticuerpo monoclonal anti-Id murino (4C10) fue generado contra un anticuerpo monoclonal de IgM humano (L612) que reconocía GM3 en melanoma humano. Sueros de ratones inmunizados con este anticuerpo monoclonal anti-Id acoplado a hemocianina de lapa californiana (KLH) reaccionaron fuertemente con una línea celular de melanoma positiva de antígeno y con GM3 purificado, lo que sugirió que este anticuerpo monoclonal anti-Id, que lleva la imagen interna de GM3 (Ab2 β), puede ser una herramienta eficaz para inmunoterapia activa específica en pacientes con melanoma (Yamamoto, S. *et al.* (1990) *J. Natl. Cáncer. Inst.* **82**, 1757-1760; Irie, R. F. patente de EE.UU. N°. 5.208.146). El VL y VH de este anticuerpo monoclonal anti-Id ha sido clonado, secuenciado y expresado como un anticuerpo de IgG1 quimérico de ratón/humano (Hastings, A. *et al.* (1992) *Cancer. Res.* **52**, 1681-1686).

45 También, un anticuerpo monoclonal anti-idiotipo del tipo alfa, que es útil en procedimientos inmunodiagnósticos, fue generado contra el anticuerpo monoclonal humano 1612 (Irie, R. F., patente de EE.UU. N°. 5.208.146).

50 El anticuerpo monoclonal BEC-2, un anticuerpo monoclonal anti-Id murino generado contra un anticuerpo monoclonal de ratón que reconocía el gangliósido GD3 (mAbR24), puede imitar a GD3 e inducir anticuerpos contra este gangliósido a pesar de la expresión de GD3 en el tejido de conejo normal (Chapman, P. B. y Houghton, A. N. (1991) **88**, 186-192). Los resultados de un estudio piloto mostraron que BEC-2 más adyuvante BCG aumentaban considerablemente la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas (*Scrip Magazine* (1996) págs. 56-59; 33ª "American Society of Clinical Oncology annual meeting" (1997)).

55 La inmunización de ratas con un anticuerpo monoclonal murino específico contra GD2 (3F8) generó anticuerpos monoclonales anti-Id que, cuando se analizaron inmunógenos en ratones, pudieron estimular anticuerpos que reaccionaron con el gangliósido GD3. Se sugirió que estos anticuerpos monoclonales anti-Id podrían ser útiles en la construcción de vacunas (Cheung, N-K. V. *et al.* (1993) *Int. J. Cancer* **54**, 499-505).

60 También, un anticuerpo monoclonal anti-Id humano fue generado usando células mononucleares de sangre periférica de un paciente que fue tratado con el anticuerpo monoclonal murino 14G2 específico contra GD2. La inmunización de conejos con este anticuerpo monoclonal anti-Id humano indujo anticuerpos anti-GD2 y una respuesta DTH frente a células tumorales antígeno-positivas. Se sugirió que este anticuerpo podía ser usado potencialmente como una vacuna anti-Id humana en pacientes con melanoma maligno (Saleh, M. N. *et al.* (1993) *J. Immunol* **151**, 3390-3398).

65 El documento EP-A-0 657 471 se refiere a anticuerpos monoclonales anti gangliósido y a su uso en inmunoterapia activa específica frente a tumores malignos. En particular, dicho documento describe la generación de un anticuerpo anti-gangliósido P3 que se une específicamente a NGcGM3 (el ácido N-glicolil-neuramónico se unió a la galactosa

interna del gangliósido GM3) y anticuerpos anti-idiotípicos generados contra dicho anticuerpo anti-gangliósido P3, cuyos anticuerpos anti-idiotípicos reconocen el antígeno original, NGcGM3.

5 En el artículo "Ganglioside vaccine: anti-idiotypic monoclonal antibodies as antigen surrogates" (Iglesias, E., *et al. Biotecnología Aplicada*, vol. **14**, N.º. 1, 1997, página 50, XP-002091466) son descritos siete anticuerpos monoclonales (MAbs) anti-idiotípicos de IgG1 que reaccionaron fuertemente con el MAb P3 y no fue observada ninguna reactividad con los otros Mabs de IgM anti-gangliósido analizados. Los siete MAbs anti-idiotípicos tenían la capacidad de bloquear la unión de P3 a NGcGM3 en un intervalo de concentración entre 1 a 10 µg/ml. Cinco de estos anti-idiotípicos fueron capaces de generar una respuesta humoral contra NGcGM3, siendo clasificados como anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos Ab2β y Ab2α.

15 Por otra parte, Pérez *et al.* ("What gangliosides show us about idiotypic networks". *Biotecnología Aplicada*, vol. **14**, N.º. 1, 1997, página 42, XP-002091467) también describe que el anticuerpo anti-gangliósido P3 generó respuestas fuertes de anti-idiotípicas IgG (Ab2, títulos de 1/10 000 a 1/50 000) en ratones Balb/c. La mayor parte de estos clones de Ab2 específicos obtenidos fueron capaces de bloquear la unión del MAb P3 a GM3 (NeuGc). Estos anticuerpos, como en el caso anterior referido, fueron capaces de inducir una respuesta del autoanticuerpo natural frente a gangliósidos, siendo también clasificados como anticuerpos anti-idiotípicos Ab2β.

20 Como es evidente a partir de estos antecedentes, hasta ahora, ningún anticuerpo monoclonal anti-idiotipo tipo gamma ha sido generado contra anticuerpos monoclonales que reconocen gangliósidos que contienen N-glicolilo que, al mismo tiempo, sea capaz de generar un efecto anti-tumoral en un modelo animal.

Descripción de la invención

25 La presente invención se refiere de forma general a anticuerpos monoclonales (mAb) anti-idiotípicos (anti-Id) y a su uso como inmunomoduladores para el tratamiento del cáncer. Más particularmente, la invención implica un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico tipo gama (Ab2γ) generado contra un anticuerpo murino contra gangliósidos que contienen N-glicolilo producidos por el hibridoma depositado con el número de entrada ECACC 94113026, siendo obtenido el Ab2γ a partir de la línea celular de hibridoma depositada con el número de entrada ECACC 97112901. Además, 30 la invención implica dicho hibridoma depositado con el número de entrada ECACC 97112901, una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de dicho anticuerpo monoclonal anti-idiotípico, junto con un diluyente, un adyuvante o una molécula transportadora; y el uso de dicho anticuerpo monoclonal para la fabricación de un medicamento para tratar neoplasias malignas.

35 Conforme a la presente invención, un objeto de esta invención es proporcionar un nuevo anticuerpo monoclonal anti-Id capaz de inducir una respuesta anti-idiotípica predominante en modelos xenogénicos y ejercer un efecto protector en ratones u otras especies de animales que padezcan tumores malignos.

Descripción detallada de la invención

40 *Procedimiento de inmunización para obtener respuesta de anticuerpo anti-idiotípico (Ab2) frente a anticuerpos monoclonales anti-gangliósido*

45 Se inmunizan ratones y otras especies de mamífero con dosis de 25-200 µg de anticuerpos monoclonales anti-gangliósido purificados con o sin adyuvante y, opcionalmente, acoplados a una proteína de transporte.

Los animales reciben 2-6 dosis de anticuerpos monoclonales anti-gangliósido en intervalos de 14 a 30 días entre dosis. Las rutas de inmunización posibles son intraperitoneal, subcutánea, intravenosa o una de sus combinaciones.

50 Antes y durante el período de inmunización, son tomadas muestras de suero de sangre del animal y la respuesta del nivel de anticuerpo Ab2 es determinada por cualquier método de inmunoensayo conocido. Las diluciones de suero del animal son incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-gangliósido usado como inmunógeno, u otros anticuerpos monoclonales anti-gangliósido que no sean usados en el protocolo de inmunización.

55 Los experimentos también fueron realizados para definir la capacidad del suero de los animales inmunizados para bloquear la unión del anticuerpo monoclonal anti-gangliósido usado como inmunógeno respecto a su antígeno.

Producción de anticuerpo monoclonal anti-idiotípico contra anticuerpos monoclonales anti-gangliósido (mAbs)

60 Los ratones con altos títulos de anticuerpo Ab2 reciben una nueva inmunización con el anticuerpo monoclonal usado como inmunógeno tres días antes de la obtención de las células que producen el anticuerpo. Preferencialmente deberían ser usadas células de bazo, aunque pueden ser seleccionadas otras células que produzcan el anticuerpo.

65 Estas células son fusionadas con células de mieloma que proporcionan a las células híbridas o hibridomas la propiedad de reproducirse *in vitro* e *in vivo*. La fusión celular puede ser realizada por cualquiera de los métodos conocidos.

ES 2 274 584 T3

Los anticuerpos producidos por los hibridomas son analizados por métodos de inmunoensayo, preferiblemente por un ensayo inmuno-enzimático en el cual los sobrenadantes de hibridoma son incubados con el anticuerpo monoclonal usado como inmunógeno y con otros anticuerpos monoclonales anti-gangliósido no usados en las inmunizaciones.

5 La capacidad del sobrenadante de hibridoma de bloquear la unión del anticuerpo monoclonal anti-gangliósido usado como inmunógeno frente a su antígeno es determinada incubando los sobrenadantes con diluciones adecuadas del anticuerpo monoclonal anti-gangliósido, seguido por la incubación de dicho anticuerpo con su antígeno.

10 Los hibridomas seleccionados son clonados al menos dos veces y los anticuerpos monoclonales resultantes son producidos *in vitro* e *in vivo*, como se describe anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos obtenidos reconocen a los anticuerpos monoclonales anti-gangliósido y pueden poseer la capacidad de bloquear la unión del anticuerpo monoclonal anti-gangliósido frente a su antígeno.

15 *Procedimiento de inmunización para obtener respuesta de anticuerpo anti-anti-idiotípico (Ab3) frente a anticuerpos monoclonales Ab2 en modelos heterólogos*

20 Se inmunizan monos u otras especies heterólogas con anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos. Estos anticuerpos monoclonales pueden ser administrados con o sin adyuvante y opcionalmente pueden ser acoplados a una proteína de transporte antes de ser usados como inmunógeno.

Cada animal recibió de 2 a 8 dosis de 250 μg a 2 mg del anticuerpo monoclonal anti-idiotípico en intervalos de tiempo de 7 a 30 días entre dosis.

25 Las rutas de inmunización pueden ser intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o una combinación de estas.

Muestras de sangre del animal son obtenidas antes y durante el protocolo de inmunización, y la presencia de la respuesta del anticuerpo Ab3 es controlada usando cualquiera de los métodos de inmunoensayo conocidos.

30 La administración del anticuerpo monoclonal anti-idiotípico, producido por la inmunización con anticuerpos monoclonales anti-gangliósido, a animales puede inducir una respuesta del anticuerpo predominante contra el idiotipo del anticuerpo monoclonal anti-idiotípico usado como inmunógeno, sin la inducción de la respuesta del anticuerpo específica del antígeno.

35 *Efecto antitumoral del tratamiento de anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos*

40 Se administran anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos en una cantidad eficaz con o sin adyuvantes y opcionalmente acoplados a una proteína de transporte antes de ser usados. La expresión "cantidad eficaz" debe ser entendida como una cantidad del anticuerpo monoclonal anti-idiotípico requerido para alcanzar un efecto antitumoral. El tratamiento con los anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos se lleva a cabo antes o después de la administración experimental de células malignas en animales.

45 Los animales reciben 1-5 dosis de 10-200 μg de los anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos en intervalos de tiempo de 7-30 días entre dosis.

Las rutas de inmunización pueden ser intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa o una combinación de estas.

50 Después del tratamiento con los anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos, la incidencia del tumor y la supervivencia en el grupo tratado con los anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos puede ser comparada con los grupos control, tratados de otra manera y mantenidos de la misma manera.

55 El tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-idiotípico aumentó considerablemente la supervivencia de animales que padecían tumores y disminuyó las metástasis pulmonar.

Ejemplo I

60 *Generación de un anticuerpo anti-idiotípico contra anticuerpo monoclonal P3 en un modelo singéneo*

Ratones hembra Balb/c, de 6-8 semanas, fueron inmunizados con dos dosis de 50 μg de anticuerpo monoclonal purificado P3 (anti-gangliósidos que contienen N-glicolilo) (Número de entrada del ECACC 94113026, solicitud de patente EP 657471 A1, Vázquez, A. M. *et al.*, *Hybridoma* (1995) 14, 551-556) acoplado a KLH, en intervalos de 14 días entre dosis.

65 Tres días después de la última inmunización, los bazo de los ratones con altos niveles de suero de anticuerpos Ab2 contra el anticuerpo monoclonal P3 fueron retirados y fue preparada una suspensión celular presionando el tejido por un tamiz de acero inoxidable o inundando el bazo.

ES 2 274 584 T3

La fusión fue realizada por el método descrito por Köhler y Milstein (1975, *Nature* (Londres) 256, 495-497), con leves modificaciones.

5 Células de bazo murinas fueron fusionadas con las células del mieloma murino no secretantes P3/X63 Ag8 6.5.3, obtenibles a partir de la ECACC, número de entrada 85011420, en una relación de 10:1, en 0,5 ml de medio de fusión que contenía polietilenglicol del 42% en medio RPMI-1640.

10 Después de la fusión, las células fueron cultivadas en un medio selectivo de HAT (hipoxantina-aminopterina y timidina) a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂ del 5%.

15 Diez a quince días después de la fusión, fue determinada la evolución de la presencia de anticuerpos en sobrenadantes de hibridoma por ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas). Las placas ELISA (de alta unión COS-TAR) fueron incubadas de la noche a la mañana a 4°C con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal P3 y otro anticuerpo monoclonal anti-gangliósido IgM, en tampón de carbonato-bicarbonato que tenía un pH de aproximadamente 9,8.

Las placas, después del lavado con PBS que contenía TWEEN 20 del 0,05% fueron bloqueadas con el mismo tampón, que contenía BSA del 1%, durante una hora a 37°C.

20 La etapa de lavado fue repetida y fueron añadidos 50 µl/pocillo de los sobrenadantes. Después de la incubación durante 2 horas, las placas fueron lavadas de nuevo, y fue añadido un antisuero conjugado de la región Fc de IgG antimurino de cabra de fosfatasa alcalina. Después del lavado, fueron añadidos 100 µl/pocillo de la solución de sustrato (1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato diluido en tampón de dietanolamina, pH 9,8). La absorbancia fue medida a 405 nm en un lector ELISA.

25 También, la capacidad de los sobrenadantes para bloquear la unión del anticuerpo monoclonal P3 a NeuGcGM3 fue determinada por ELISA indirecto realizado sobre placas activadas con poli(cloruro de vinilo) (ICN-FLOW) con NeuGcGM3 inmovilizado, de acuerdo con el método siguiente: Cincuenta microlitros del gangliósido en metanol (4 µg/ml) fueron añadidos a cada pocillo. El metanol fue evaporado colocando las placas a 37°C durante una hora. Más tarde, fueron añadidos 150 µl/pocillo de tampón TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,8 que contenía BSA del 1% a cada pocillo y las placas fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos.

30 Sobrenadantes del hibridoma fueron incubados con 4 µg/ml de anticuerpo monoclonal P3 durante 3 horas a 37°C y después fueron añadidos a cada pocillo 50 µl de las mezclas, y las placas fueron incubadas a 37°C durante 90 minutos.

35 Los pocillos fueron lavados 4 veces con 200 µl de PBS, y fueron añadidos 50 µl de antisuero de conjugado de inmunoglobulinas antiratón de fosfatasa alcalina, suficientemente diluidos. Después del lavado con PBS, los pocillos fueron incubados con la solución del sustrato como se describe anteriormente.

40 Fue obtenido un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico, llamado 1E10, de la subclase IgG1. Este anticuerpo monoclonal anti-IdP3 1E10 era muy específico al anticuerpo monoclonal P3 usado como inmunógeno. Éste no reaccionó con otros anticuerpos anti-gangliósido, tales como E1, A3 y F6 (figura 1). Este anticuerpo monoclonal anti-idiotípico fue capaz de inhibir la unión del anticuerpo monoclonal P3 a NeuGcGM3 (figura 2) y a una línea celular de tumor de mama P3 positiva.

Ejemplo II

45 *Generación de respuesta de anticuerpo anti-anti-idiotípica (Ab3) frente a anticuerpo monoclonal anti-Id 1E10 en un modelo heterólogo*

50 Fue usado el anticuerpo monoclonal anti-IdP3 1E10 precipitado por hidróxido de aluminio para inmunizar intradermalmente monos *Cynomologus* con una dosis de 2 mg de anticuerpo monoclonal por inyección en intervalos de 14 días. Los animales recibieron varias dosis del anticuerpo monoclonal.

55 Las muestras de suero fueron tomadas antes y después de las inmunizaciones. La presencia de respuesta de anticuerpo Ab3 en el suero de mono fue determinada por ELISA. Las placas ELISA (de alta unión Costar) fueron incubadas de la noche a la mañana a 4°C con 10 µg/ml del anticuerpo monoclonal 1E10 o sus fragmentos F(ab')₂ en tampón de carbonato-bicarbonato, pH 9,8.

60 Después del lavado, las placas, con PBS que contenía TWEEN 20 del 0,05%, fueron bloqueadas con el mismo tampón, que contenía BSA del 1%, durante una hora a 37°C.

65 La etapa de lavado fue repetida y fueron añadidos 50 µl/pocillo de diferentes diluciones de suero. Después de la incubación durante 2 horas a 37°C, las placas fueron lavadas de nuevo y fueron añadidos inmunoglobulina anti-humano de cabra de fosfatasa alcalina, anti-IgM o antisuero de conjugado de Anti-IgG. Después del lavado, la solución del sustrato fue añadida como se describe antes.

ES 2 274 584 T3

Fueron realizados experimentos de bloqueo para distinguir entre las respuestas del anticuerpo anti-isotípicas y anti-idiotípicas.

5 El suero de mono fue incubado de la noche a la mañana a 4°C con 500 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo monoclonal con el mismo isotipo que el anticuerpo monoclonal 1E10, pero con una especificidad diferente. La reactividad del suero remanente contra el anticuerpo monoclonal 1E10 entonces fue medida por ELISA, como se describe anteriormente.

10 Los sueros de mono fueron comprobados respecto a su capacidad de inhibir la unión del anticuerpo monoclonal P3 biotinilado frente a los fragmentos F(ab')_2 del anticuerpo monoclonal 1E10 sobre placas ELISA revestidas usando el método ELISA descrito anteriormente, aunque de la incubación de las placas revestidas con las diluciones de suero, fueron añadidos a cada pocillo 50 μl del anticuerpo monoclonal P3 biotinilado. Después de una incubación durante una hora a 37°C, las placas fueron lavadas y fueron añadidos a cada pocillo 50 μl de complejo avidin-biotin-peroxidasa y fueron incubados durante una hora a 37°C. Después del lavado, fue añadido el tampón del sustrato (8 mg de o-fenilendiamina en 12 ml de tampón de fosfato-citrato, pH 5,0). La absorbancia fue medida a 492 nm en un lector de 15 placas ELISA.

Sueros de monos inmunizados con anticuerpo monoclonal anti-IdP3 1E10 reaccionaron fuertemente con los fragmentos F(ab')_2 1E10 (figura 3). Sueros de monos inmunizados se unieron específicamente al anticuerpo monoclonal 1E10 inmunizado, con menos reactividad con anticuerpos monoclonales no relacionados (ior C5). La presencia de anticuerpos frente al idiotipo 1E10 fue confirmada después de que los sueros del animal fueran incubados con el anticuerpo monoclonal no pertinente, debido a una fuerte reactividad de los sueros adsorbidos con el anticuerpo monoclonal antiideotipo P3 1E10. Sorprendentemente, la respuesta del anticuerpo anti-idiotípico inducida fue superior en comparación a la respuesta del anticuerpo anti-isotípica generada (figura 4). Los sueros de Ab3 de mono también inhibieron la unión de anticuerpo monoclonal P3 biotinilado frente al anticuerpo monoclonal anti-Id 1E10, indicando que los sueros Ab3 de mono compartían idiotopos con el anticuerpo monoclonal P3 (figura 5). Una respuesta de anticuerpo IgG predominante fue generada contra el anticuerpo monoclonal anti-IdP3 1E10 (figura 6). Sueros de monos reaccionaron con los fragmentos de F(ab')_2 1E10 hasta 4 meses después de que los animales recibieran la última inmunización (figura 7). Los anticuerpos Ab3 con capacidad inhibitoria de unión del mAb P3 a 1E10 también fueron detectados en aquel tiempo. Ningún anticuerpo contra NeuGcGM3 fue detectado en los sueros de 30 animales.

Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal anti-idiotípico 1E10 es del tipo gamma, ya que el anticuerpo monoclonal anti-idiotípico 1E10 es capaz de inhibir la unión del anticuerpo monoclonal P3 con su antígeno y no es capaz de inducir la producción de anticuerpos del tipo P3 en los animales.

35 Ejemplo III

Tratamiento de ratones con anticuerpo monoclonal anti-Id 1E10

40 Fueron inmunizados ratones C57BL/6 con cinco dosis de 50 μg de anticuerpo monoclonal anti-IdP3 1E10 precipitado por hidróxido de aluminio en intervalos de 14 días. Una semana más tarde, a los ratones les fue inyectado subcutáneamente 5×10^3 células de melanoma B16. Los animales que fueron tratados de la misma manera, pero que no recibieron el anticuerpo monoclonal, fueron usados como controles. Se muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer en la figura 8, la supervivencia fue considerablemente mejor en el grupo que fue inmunizado con anticuerpo monoclonal anti-IdP3 1E10 que en el grupo de control.

Se les inoculó intravenosamente a ratones C57BL/6 con 50×10^3 células Lewis de cáncer de pulmón. Catorce días más tarde, 10 mg de 1E10 fueron administrados intravenosamente. Después de 6 días, los ratones fueron sacrificados y el número de metástasis pulmonar fue contado. Los animales tratados con un anticuerpo monoclonal IgG no relacionado o que recibieron sólo PBS fueron usados como controles. Siete de los 10 animales tratados con anticuerpo monoclonal anti-P3 1E10 no desarrollaron metástasis pulmonar. En otros 3 animales, el número máximo total de metástasis fue 3. A la inversa, todos los animales que fueron tratados con IgG1 no relacionado o que recibieron sólo PBS desarrollaron metástasis pulmonar. Estos resultados indican que el tratamiento con este anticuerpo monoclonal anti-Id tipo gama tenía un efecto protector contra tumores.

55 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la reactividad del anticuerpo monoclonal anti-IdP3 1E10 contra anticuerpos monoclonales anti-gangliósido P3, E1, A3 y F6.

60 La figura 2 muestra los resultados de un ensayo de inhibición en el que el anticuerpo monoclonal P3 fue incubado con el anticuerpo monoclonal anti-IdP3 1E10, y más tarde la reactividad del anticuerpo monoclonal P3 frente a NeuGcGM3 fue medida por ELISA.

65 La figura 3 muestra la reactividad de anticuerpos de suero de mono con los fragmentos F(ab')_2 de 1E10 medidos por ELISA después de que el animal recibiera diferentes dosis del anticuerpo monoclonal de anti-Id 1E10 precipitado por hidróxido aluminio.

ES 2 274 584 T3

La figura 4 muestra los resultados de un ensayo de inhibición, en el que ambas reactividades fueron medidas por ELISA, la de un suero no-preadsorbido de mono con anticuerpo monoclonal 1E10 (-■-) y la de un suero no-preadsorbido de mono con anticuerpo monoclonal ior C5 de isotipo acoplado no relacionado (-●-), así como la unión de anticuerpos de suero frente a anticuerpos monoclonales 1E10 (-□-) y anticuerpo monoclonal ior C5 no relacionado (-○-). Las flechas indican el tiempo de inmunización y las líneas continuas el tiempo de toma de las muestras de sangre.

La figura 5 muestra la inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal P3 a el anticuerpo monoclonal anti-Id 1E10 por el suero de un mono que fue inmunizado con el anticuerpo monoclonal 1E10, medido por ELISA. Las flechas indican el tiempo de inmunización y las líneas continuas el tiempo de toma de las muestras de sangre.

La figura 6 muestra la cinética de la respuesta del anticuerpo de IgM e IgG contra el anticuerpo monoclonal 1E10 en el suero de un mono que fue inmunizado con el anticuerpo monoclonal anti-idiotípico, medido por ELISA. Las flechas indican el tiempo de inmunización y las líneas continuas el tiempo de toma de las muestras de sangre.

La figura 7 muestra el reconocimiento de los fragmentos F(ab')₂ 1E10 por suero preinmune de mono; por el suero obtenido después de que el mono recibiera la última dosis de anticuerpo monoclonal anti-Id 1E10 precipitado por hidróxido de aluminio (indicado con la flecha), y por el suero obtenido 4 meses después de que el animal recibiera la última inmunización.

La figura 8 muestra las curvas de Kaplan-Meyer para la supervivencia en ratones tratados con anticuerpo monoclonal anti-IdP3 1E10 e inoculados con células de melanoma B16.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico tipo gamma (Ab2 γ) generado contra un anticuerpo murino contra gangliósidos que contienen N-glicolilo producidos por el hibridoma depositado con el número de entrada ECACC 94113026, siendo el Ab2 γ obtenido a partir de la línea celular de hibridoma depositada con el número de entrada ECACC 97112901.

10 2. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, depositado con el número de entrada ECACC 97112901.

3. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anti-idiotípico de la reivindicación 1, junto con un diluyente, un adyuvante o una molécula transportadora.

15 4. El uso del anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para tratar neoplasias malignas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

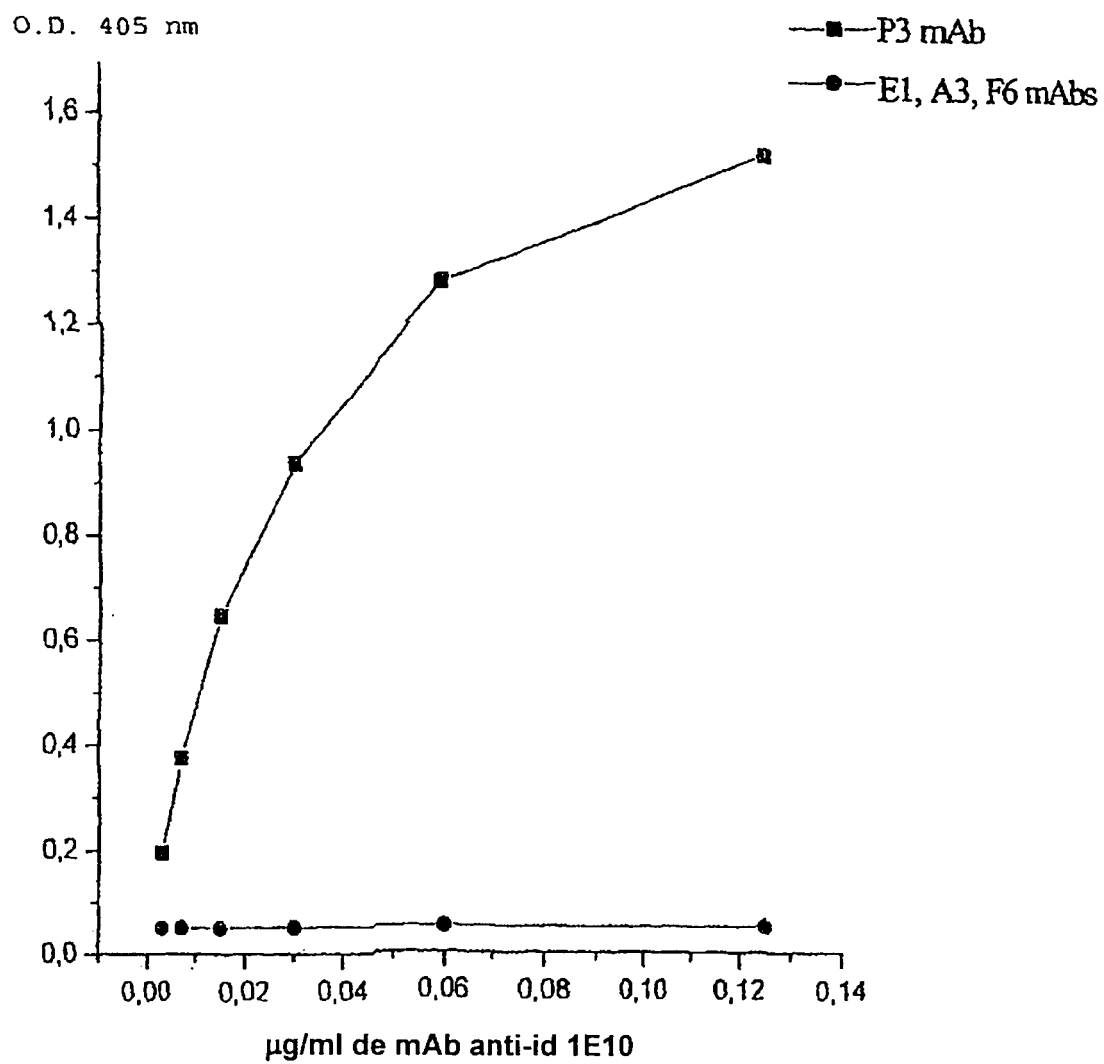


FIG. 1

O.D. 405 nm

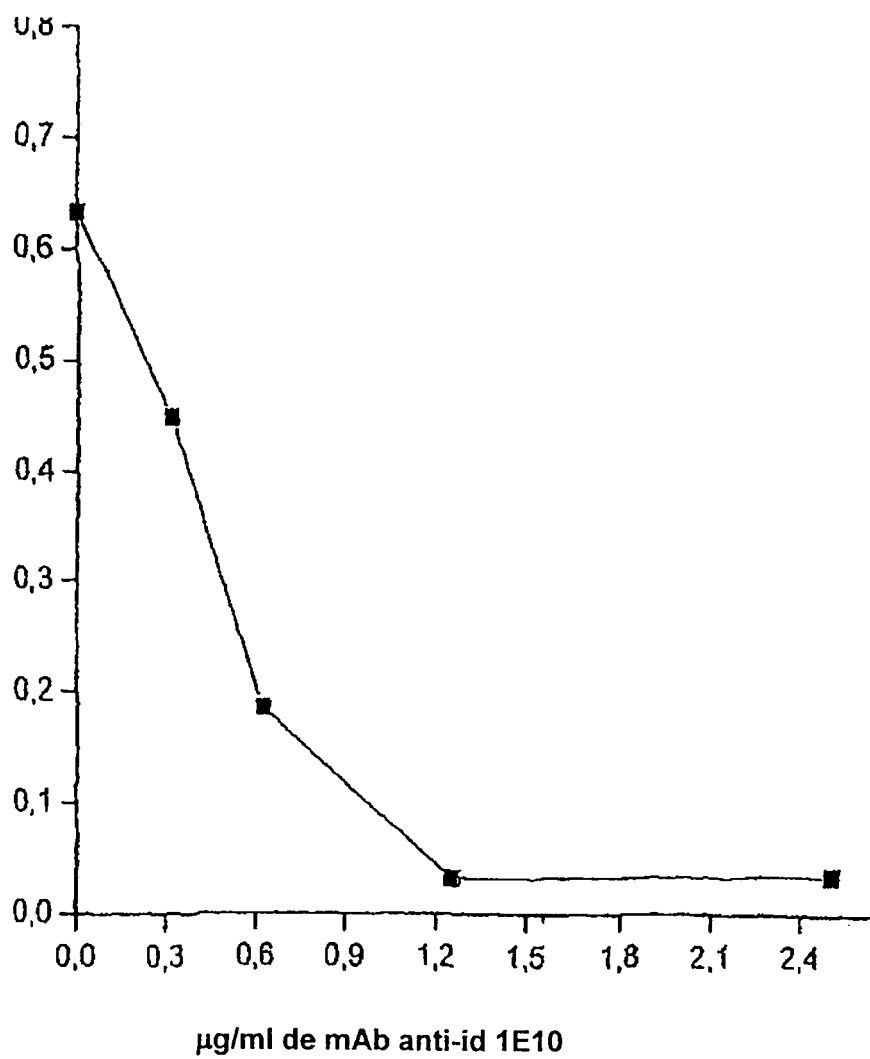


FIG. 2

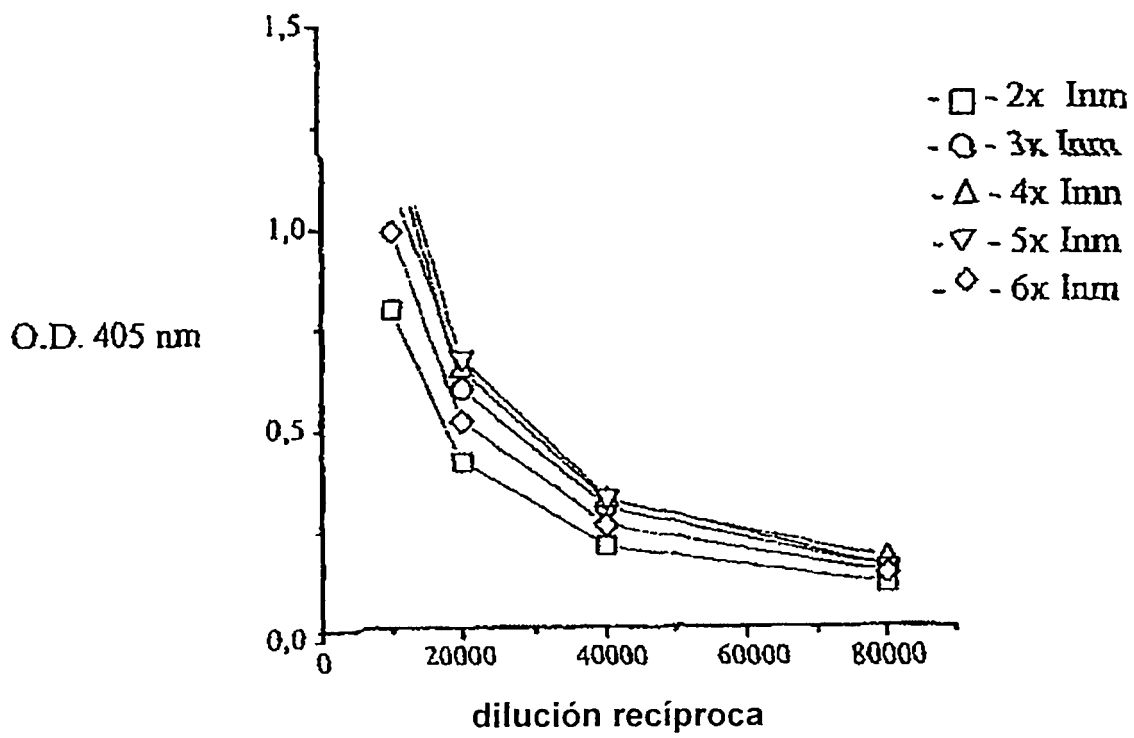


FIG. 3

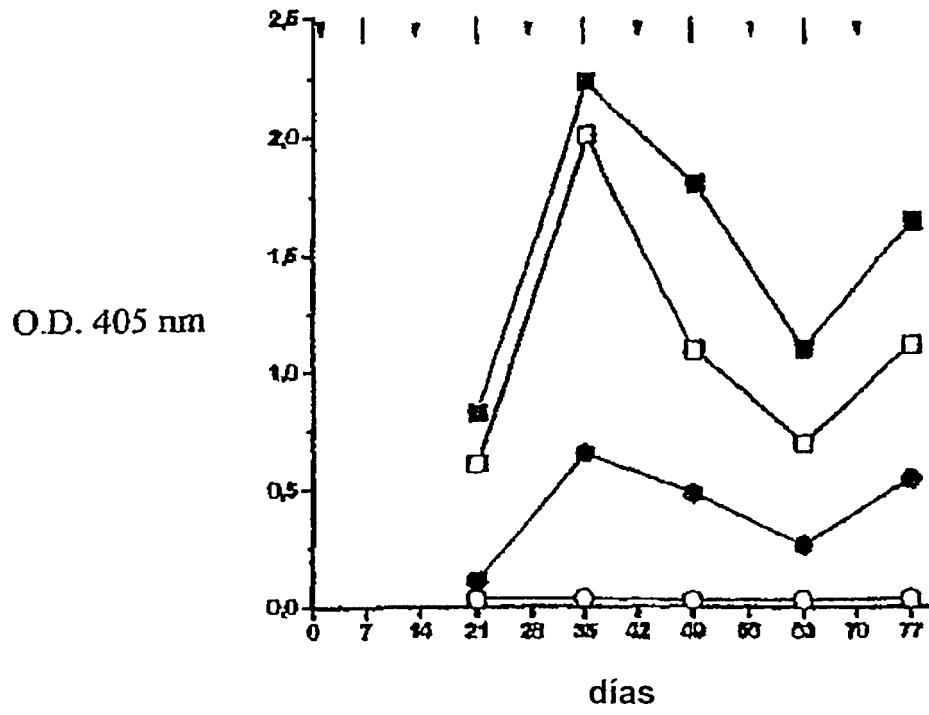


FIG. 4

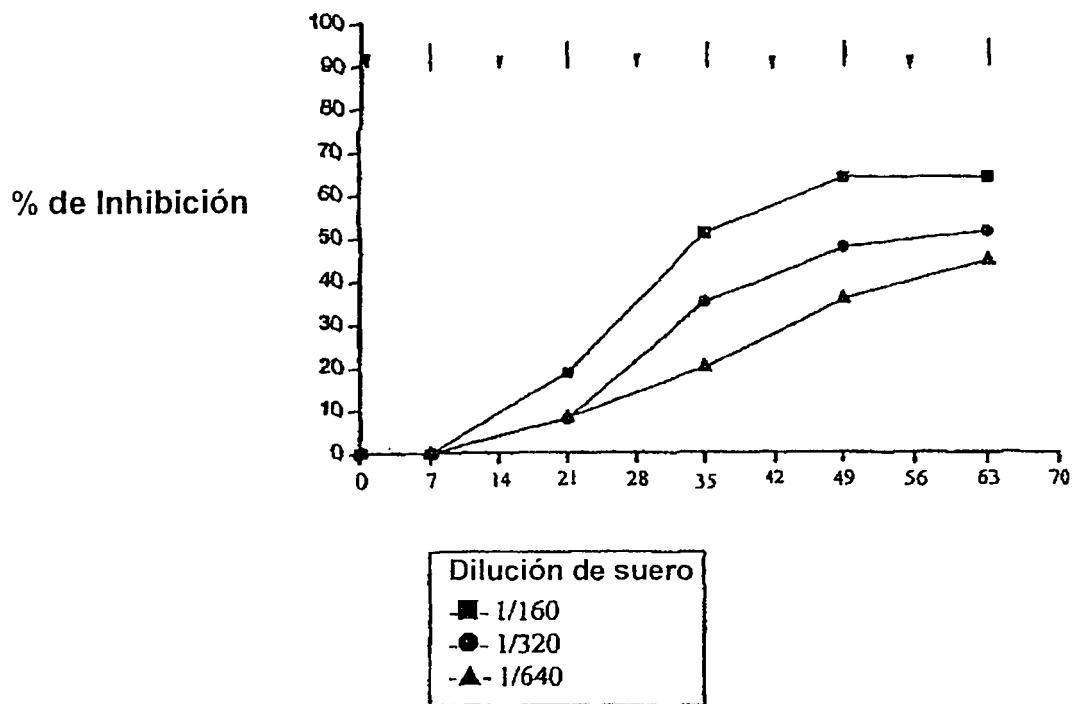


FIG. 5

O.D. 405 nm

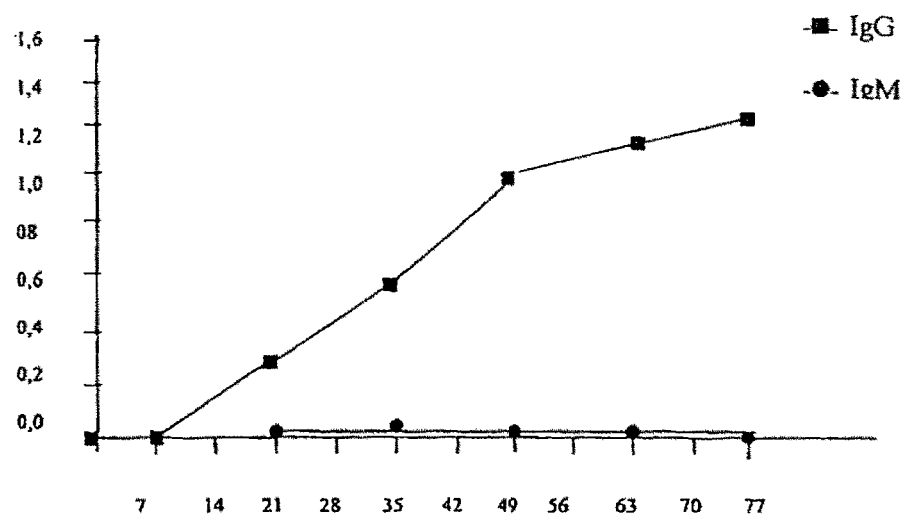


FIG. 6

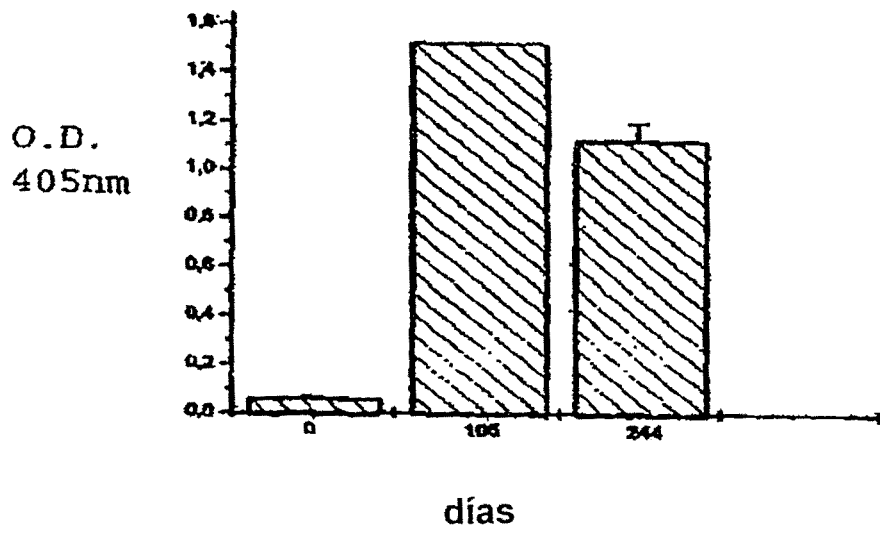


FIG 7

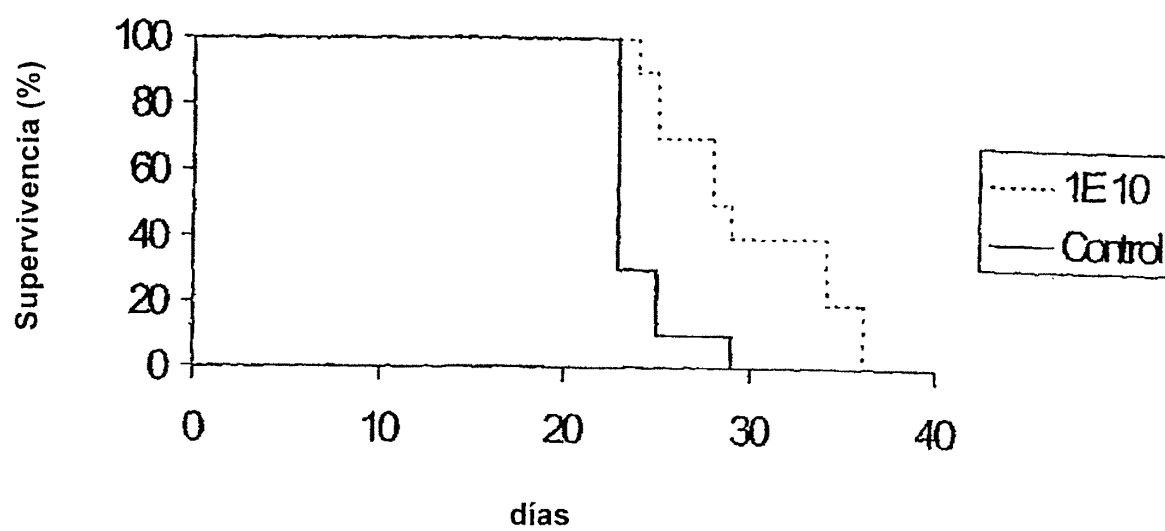


Fig. 8