

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 943 710**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2015.01)

C07K 16/46 (2015.01)

A61P 35/00 (2010.01)

A61P 43/00 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2014** **PCT/EP2014/003009**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015** **WO15067375**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2014** **E 14806173 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2023** **EP 3068802**

54 Título: **Anticuerpo contra el gangliósido GD2 o-acetilado con actividad proapoptótica**

30 Prioridad:

11.11.2013 EP 13005298

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

15.06.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LE DOUSSAL, JEAN-MARC;
TERME, MICKAËL y
DORVILLIUS, MYLENE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 943 710 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo contra el gangliósido GD2 o-acetilado con actividad proapoptótica

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos y sus usos en terapias contra el cáncer.

Antecedentes de la invención:

10

Se demostró previamente que los cánceres de origen neuroectodérmico expresan específicamente el gangliósido GD2 O-acetilado y que un anticuerpo terapéutico dirigido al gangliósido GD2 O-acetilado (mAb 8B6) puede administrarse y mostrar efectos beneficiosos sin neurotoxicidad, especialmente debido a la ausencia de expresión de este antígeno canceroso en células sanas, en particular en nervios periféricos.

15

La potente actividad del anti-OAcGD2 murino IgG3, κ mAb 8B6 se describió en ALVAREZ-RUEDA y otros (PLoS One, vol.6 (9), pág.:e25220, 2011). Este anticuerpo tiene una actividad ADCC y CDC eficiente *in vitro*, y también muestra una actividad proapoptótica (COCHONNEAU y otros, Cancer Lett., vol.333 (2), págs.: 194-204, 2013). Este anticuerpo también induce la muerte celular por una ruta apoptótica correspondiente a la inhibición de la proliferación de células tumorales positivas para OAcGD2 en cultivo mediante la detención del ciclo celular y apoptosis *in vitro*.

20

Natsume y otros (Cancer Res 2008; 68: (10). 15 de mayo de 2008) generó un conjunto de variantes de anticuerpos anti-CD20 que tienen regiones constantes de cadena pesada de isotipos quiméricos al mezclar los isotipos IgG1 e IgG3 humanos. Entre estas variantes, algunas construcciones mostraron un valor terapéutico mejorado en el que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se potencian simultáneamente de los anticuerpos terapéuticos.

25

La inmunoterapia pasiva realizada con mAb 8B6 para OAcGD2 es efectiva para suprimir el crecimiento de tumores que expresan OAcGD2 en tres modelos animales. Se demostró que la función lítica de las células NK no es un requisito para la actividad *in vivo* de mAb 8B6 (COCHONNEAU y otros, mencionado anteriormente, 2013).

30

Ahora, para desarrollar un anticuerpo humanizado, los inventores han generado un anticuerpo quimérico humano-ratón, denominado c8B6 (IgG1, κ). El método para producir este anticuerpo se describe en la solicitud de patente US 2010/150910 A1.

35

Álvarez-Rueda estableció un anticuerpo quimérico ratón/humano específico para el gangliósido GD2 denominado c.60C3 que tiene actividades ADCC y CDC más potentes que su contraparte de ratón (Clin Cancer Res 2007;13(Suplemento 18) 15 de septiembre de 2007). Sin embargo, c.60C3 es inefectivo para inducir la muerte por apoptosis de las células tumorales que expresan GD2.

40

Mientras que este anticuerpo c8B6 mostró una actividad *in vivo* comparable a la de los modelos tumorales en ratones inmunocompetentes, se observó una pérdida completa de la actividad proapoptótica en comparación con el mAb 8B6 murino *in vitro*. Por tanto, se previó que la pérdida de actividad proapoptótica de mAb c8B6 resulta de la pérdida de estructuras específicas que difieren entre la IgG3 murina y la IgG1 humana.

45

En consecuencia, se concluyó que no puede realizarse una quimerización humana de IgG1 para obtener un agente terapéutico valioso.

Resumen de la invención

50

Ahora, los inventores han demostrado sorprendentemente que una mutación específica en el CH1 γ 1 de c8B6 o su sustitución por un CH1 γ 3 dan lugar a la restauración de la actividad proapoptótica. En consecuencia, parece que, en el c8B6, el emparejamiento entre la cadena ligera y la cadena pesada de la IgG1 humano -atípico debido a la ausencia de cisteína cerca de la posición 133 en el dominio CH1 γ 1 humana- se asocia a la pérdida de actividad proapoptótica de este anticuerpo.

55

Por tanto, el anticuerpo obtenido comprende la buena combinación de las propiedades de IgG1, es decir, la actividad ADCC y una vida media prolongada, con una actividad proapoptótica.

60

En consecuencia, la presente invención se refiere a un anticuerpo, o a un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo que comprende un dominio CH1, que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicho anticuerpo que comprende:

a) una cadena ligera que comprende tres regiones complementarias de cadena ligera (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

65

i) la CDR1 de cadena ligera: QSLLKNNGNTFL (SEQ ID NO:1);

ii) la CDR2 de cadena ligera: KVS;

5 iii) la CDR3 de cadena ligera: SQSTHIPYT (SEQ ID NO:2); y

cuatro regiones marco de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina y un dominio CL kappa (κ) humano; y

10 b) una cadena pesada que comprende tres regiones complementarias de cadena pesada (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

i) la CDR1 de cadena pesada: EFTFTDYY (SEQ ID NO: 3);

15 ii) la CDR2 de cadena pesada: IRNRANGYTT (SEQ ID NO: 4);

iii) la CDR3 de cadena pesada: ARVSNWAFDY (SEQ ID NO: 5); y

cuatro regiones marco de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina, y:

20 1) los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana, y

2) un dominio CH1 de una IgG1 humana, en donde el aminoácido en la posición 133 o 134 de la SEQ ID NO: 29, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat y otros, se ha sustituido por un residuo de cisteína, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o un dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos uno de dichos anticuerpos y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a la composición farmacéutica mencionada anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer que expresa el gangliósido GD2 O-acetilado, tal como neuroblastomas, melanomas, glioblastomas, cánceres de pulmón de células pequeñas, cánceres de mama y cánceres de células madre cancerosas.

Adicionalmente, la solicitud describe un método para tratar un cáncer que comprende proporcionar a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica que comprende al menos uno de dichos anticuerpos, o al menos un fragmento funcional del mismo.

Adicionalmente, la solicitud describe además el uso de al menos uno de dichos anticuerpos, o de al menos un fragmento funcional del mismo para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir el cáncer.

Finalmente, la presente invención se refiere a un método para aumentar la eficacia terapéutica de un anticuerpo, o un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo que comprende un dominio CH1, que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicho anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende tres regiones complementarias de cadena ligera (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

50 i) la CDR1 de cadena ligera: QSLLKNNGNTFL (SEQ ID NO:1);

ii) la CDR2 de cadena ligera: KVS;

55 iii) la CDR3 de cadena ligera: SQSTHIPYT (SEQ ID NO:2); y

cuatro regiones marco de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina y un dominio CL kappa (κ) humano; y

60 b) una cadena pesada que comprende tres regiones complementarias de cadena ligera (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

i) la CDR1 de cadena pesada: EFTFTDYY (SEQ ID NO: 3);

ii) la CDR2 de cadena pesada: IRNRANGYTT (SEQ ID NO: 4);

65 iii) la CDR3 de cadena pesada: ARVSNWAFDY (SEQ ID NO: 5); y

cuatro regiones marco de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina, y:

1) los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana, y

2) un dominio CH1 de una IgG1 humana (CH1 γ 1),

dicho método comprende la etapa de sustituir el aminoácido en la posición 133 o 134 de la SEQ ID NO:29 del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat y otros, por un residuo de cisteína, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o de sustituir dicho dominio CH1 γ 1 humano por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humana.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra las secuencias de cadena ligera y pesada del anticuerpo c8B6.

La figura 2 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.14a.

La figura 3 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.14b.

La figura 4 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.15.

La figura 5 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.16.

La figura 6 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.17.

La figura 7 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.18.

La figura 8 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.19.

La figura 9 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.15b.

La figura 10 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.20.

La figura 11 muestra la secuencia de los dominios CH1 y bisagra del anticuerpo 301.21.

La figura 12 muestra la citotoxicidad directa de los anticuerpos anti-OacGD2 por el yoduro de propidio.

Descripción detallada

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo, o un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo que comprende un dominio CH1, que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicho anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende tres regiones complementarias de cadena ligera (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

i) la CDR1 de cadena ligera: QSLLKNNGNTFL (SEQ ID NO:1);

ii) la CDR2 de cadena ligera: KVS;

iii) la CDR3 de cadena ligera: SQSTHIPYT (SEQ ID NO:2); y

cuatro regiones marco de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina y un dominio CL kappa (κ) humano; y

b) una cadena pesada que comprende tres regiones complementarias de cadena pesada (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

i) la CDR1 de cadena pesada: EFTFTDYY (SEQ ID NO: 3);

ii) la CDR2 de cadena pesada: IRNRANGYTT (SEQ ID NO: 4);

iii) la CDR3 de cadena pesada: ARVSNWAFDY (SEQ ID NO: 5); y

cuatro regiones marco de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina, y:

1) los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana, y

2) un dominio CH1 de una IgG1 humana, en donde el aminoácido en la posición 133 o 134 de la SEQ ID NO: 29, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat y otros, se ha sustituido por un residuo de cisteína, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o un dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

Dicho anticuerpo tiene una actividad proapoptótica restaurada contra células que expresan gangliósido GD2 O-acetilado, mientras que también exhibe propiedades IgG1 como actividad ADCC y vida media.

Un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina que corresponde a un tetrámero que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) idénticas (aproximadamente 50-70 kDa en toda su longitud) y dos cadenas ligeras (L) idénticas (aproximadamente 25 kDa en toda su longitud) interconectadas por enlaces disulfuro. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa y lambda.

La cadena pesada se clasifica como gamma para la IgG. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada N-terminal (abreviada en la presente descripción como HCVR) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios (CH1, CH2 y CH3) para IgG, con un dominio bisagra entre los dominios CH1 y CH2.

Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera N-terminal (abreviada en la presente descripción como LCVR) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada HCVR y LCVR se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con convenciones bien conocidas (IMGT, The International Immunogenetics Information System®, LEFRANC y otros, Nucleic Acids Research, vol. 27, págs.: 209-212, 1999). La capacidad funcional del anticuerpo para unirse a un antígeno particular depende de las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada y está determinada en gran medida por las CDR.

El término "fragmentos funcionales" como se usa en la presente se refiere a fragmentos de anticuerpos, que se unen específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado y que comprenden el dominio CH1. Dichos fragmentos pueden ser simplemente identificados por el experto en la técnica y comprenden, como ejemplo, el fragmento F_{ab} (por ejemplo, por digestión con papaína), el fragmento F_{ab}' (por ejemplo, por digestión con pepsina y reducción parcial), el fragmento F_{(ab')₂} (por ejemplo, por digestión con pepsina), el fragmento F_{acb} (por ejemplo, por digestión con plasmina), y también el fragmento F_d (por ejemplo, por digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación) se abarcan en la invención.

Dichos fragmentos pueden producirse por escisión enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, como se conoce en la técnica y/o como se describe en la presente descripción. Los anticuerpos pueden producirse, además, en una variedad de formas truncadas mediante el uso de los genes de anticuerpos en los cuales uno o más codones de parada se han introducido corriente arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, un gen de combinación que codifica una porción de cadena pesada F_{(ab')₂} puede diseñarse para incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH₁ y/o la región bisagra de la cadena pesada. Las diversas porciones de anticuerpos pueden unirse químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua mediante el uso de técnicas de ingeniería genética.

La expresión "que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado" se refiere a un K_D de menor que 2×10^{-7} M.

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

Los anticuerpos útiles en la invención se producen de forma recombinante, ya que se requiere la manipulación de los anticuerpos típicamente murinos u otros anticuerpos no humanos con la especificidad adecuada para convertirlos en forma humanizada. Los anticuerpos pueden o no estar glicosilados, aunque se prefieren los anticuerpos glicosilados. Como es bien conocido, los anticuerpos se reticularan mediante enlaces disulfuro.

De acuerdo con una modalidad preferida, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo quimérico.

Por la expresión "anticuerpo quimérico" se entiende un anticuerpo compuesto por regiones variables de una inmunoglobulina murina y por regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Esta alteración consiste simplemente en sustituir la región constante del ratón por una región constante humana, lo que resulta, por tanto, en una quimera humana/murina que puede tener una inmunogenicidad lo suficientemente baja como para ser aceptable para uso farmacéutico. Para la presente invención, dicho anticuerpo quimérico comprende las regiones constantes

de las cadenas ligera y pesada humanas. Se han descrito varios métodos para producir dichos anticuerpos quiméricos, por tanto, forman parte del conocimiento general del experto en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5,225,539).

5 De acuerdo con otra modalidad preferida, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado.

Por "anticuerpo humanizado" se entiende un anticuerpo que está compuesto parcial o totalmente por secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de anticuerpos humanos mediante la alteración de la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) no humanas. Esta humanización de la
10 región variable del anticuerpo y, eventualmente, de la CDR se realiza mediante técnicas que ya son bien conocidas en la técnica.

Como ejemplo, la Solicitud de patente británica GB 2188638A y la Patente de Estados Unidos n.º 5,585,089 describen procesos en donde se producen anticuerpos recombinantes donde la única porción del anticuerpo que se
15 sustituye es la región determinante de la complementariedad, o "CDR". La técnica de injerto de CDR se ha usado para generar anticuerpos los cuales consisten en CDR murinas y regiones constantes y marco de regiones variables humanas (véase, por ejemplo, RIECHMANN y otros, Nature, vol.332, págs.: 323-327, 1988). Estos anticuerpos retienen las regiones constantes humanas que son necesarias para la función efectora dependiente de Fc, pero es mucho menos probable que evoquen una respuesta inmune contra el anticuerpo.

20 Como ejemplo, las regiones marco de las regiones variables se sustituyen por las correspondientes regiones marco humanas que dejan la CDR no humana sustancialmente intacta, o incluso que sustituyen la CDR por secuencias derivadas de un genoma humano. Los anticuerpos totalmente humanos se producen en ratones modificados genéticamente cuyo sistema inmune se ha alterado para corresponder al sistema inmune humano. Como se
25 mencionó anteriormente, es suficiente para su uso en los métodos de la invención, emplear un fragmento inmunológicamente específico del anticuerpo, que incluye fragmentos que representan formas de cadena simple.

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

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

40 1) Debido a que la porción efectora es humana, puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmune humano (por ejemplo, destruir las células objetivo de manera más eficiente mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)).

45 2) El sistema inmune humano no debe reconocer el marco o la región C del anticuerpo humanizado como extraño y, por lo tanto, la respuesta del anticuerpo contra dicho anticuerpo inyectado debe ser menor que contra un anticuerpo no humano totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño.

50 3) Se ha informado que la vida media de los anticuerpos no humanos inyectados en la circulación humana es mucho más corta que la vida media de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados inyectados tendrán una semivida esencialmente idéntica a la de los anticuerpos humanos de origen natural, lo que permitirá administrar dosis más pequeñas y menos frecuentes.

Como ejemplo, el diseño de inmunoglobulinas humanizadas puede llevarse a cabo de la siguiente manera: Cuando un aminoácido entra en la siguiente categoría, el aminoácido marco de una inmunoglobulina humana que se usará (inmunoglobulina aceptora) se sustituye por un aminoácido marco de una inmunoglobulina no humana proveedora de CDR (inmunoglobulina donante): (a) el aminoácido en la región marco humana de la inmunoglobulina aceptora es inusual para la inmunoglobulina humana en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es típico para la inmunoglobulina humana en esa posición; (b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a una de las CDR; o (c) cualquier átomo de la cadena lateral de un aminoácido del marco está dentro de aproximadamente 5-6 angstroms (de centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido CDR en un modelo tridimensional de inmunoglobulina (QUEEN y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, pág.:2869, 1991). Cuando cada uno de los aminoácidos de la región marco humana de la inmunoglobulina aceptora y un aminoácido correspondiente de la inmunoglobulina donante es inusual para la inmunoglobulina humana en esa posición, dicho aminoácido se sustituye por un aminoácido típico de la inmunoglobulina humana en esa posición.

65

Ventajosamente, dicho anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera (LCVR) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO :6 y/o la región variable de cadena pesada (HCVR) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO :7.

5	La SEQ ID NO: 6	DVVMQTPTLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLL KNNGNTFLHW YLQKSGQSPK LLIYKVS NRL SGVPDRFSGS GSGTYFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHIP YTFGGGKLE IK
10	La SEQ ID NO: 7	EVKLVESGGG LVLPGDSLRL SCATSEFTFT DYYMTWVRQP PRKALEWLGF IRNRANGYTT EYNPSVKGRF TISRDNSQSI LYLQMNTLRT EDSATYYCAR VSNWAFDYWG QGTTTLTVSS
15		

Un dominio CL kappa (κ) humano es bien conocido por el experto en la técnica y corresponde, como ejemplo, a la SEQ ID NO: 8.

20	La SEQ ID NO: 8	RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
25		

Preferentemente, el anticuerpo de la invención tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

30	La SEQ ID NO: 9	DVVMQTPTLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLKNNGNTFLHWYLQ KSGQSPKLLIYKVS NRLSGVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAED LGVYFCSQSTHIPYTFGGGKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
35		
40		

Los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana son bien conocidos por el experto en la técnica y corresponden como ejemplo a la SEQ ID NO: 10.

45	La SEQ ID NO: 10	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
50		
55		

El dominio CH1 de una IgG1 humana es bien conocido por el experto en la técnica. Como se usa en la presente, un "dominio CH1, mutado para restaurar el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas", se refiere a un dominio CH1 humano de una IgG1 humana en donde se substituyó un aminoácido por un residuo de cisteína, preferentemente para presentar un residuo de cisteína en la posición 133 o 134 de la secuencia CH1. La numeración de la región constante es la del índice EU como se establece en Kabat y otros (1991, NIH Publication n°91-3242, National technical Information Service Springfield, VA). Como ejemplo, el dominio CH1 de una IgG1 humana corresponde a la SEQ ID NO: 29. Dicho dominio CH1, cuando muta para restaurar el emparejamiento típico de IgG entre CH1 y las cadenas ligeras típicas de las otras subclases de IgG, corresponde a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en donde el residuo de serina en la posición 133 se ha substituido por una cisteína o por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, en donde el residuo de serina

en la posición 134 se ha sustituido por una cisteína. El residuo de cisteína en la posición 133 o 134 de la secuencia CH1 restaura un enlace disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada de los anticuerpos de la invención.

5	La SEQ ID NO: 29	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKV
10	La SEQ ID NO: 11	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKV
15	La SEQ ID NO: 30	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKV

El dominio CH1 de una IgG2, IgG3 e IgG4 humana son bien conocidos por el experto en la técnica. Como ejemplo, el dominio CH1 de una IgG2 humana corresponde a la SEQ ID NO: 31, el dominio CH1 de una IgG3 humana corresponde a la SEQ ID NO: 12, y el dominio CH1 de una IgG4 humana corresponde a la SEQ ID NO: 32.

25	La SEQ ID NO: 31	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTQSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTV
30	La SEQ ID NO: 12	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTC NVNHKPSNTKVDKRV
35	La SEQ ID NO: 32	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTQSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKRV

De acuerdo con una primera modalidad preferida, el anticuerpo de la invención comprende un dominio CH1 mutado de una IgG1 humana que presenta un residuo de cisteína en la posición 133 o 134 de su secuencia, preferentemente dicho dominio tiene la secuencia de SEQ ID NO: 11.

Aún, preferentemente, dicho anticuerpo se selecciona en el grupo que comprende 301.14a, 301.14b, 301.16 y 301.18.

De acuerdo con una segunda modalidad preferida, el anticuerpo quimérico de la invención comprende un dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana, preferentemente dicho dominio es un dominio CH1 de una IgG3, tal como la secuencia de SEQ ID NO: 12.

Aún, preferentemente, dicho anticuerpo se selecciona en el grupo que comprende 301.15, 301.15b, 301.17 y 301.19.

El anticuerpo quimérico de la invención comprende, además un dominio bisagra de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humana o un derivado de un dominio bisagra de una IgG1 humana, o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana.

El dominio bisagra de una IgG1 humana es bien conocido por el experto en la técnica y corresponde como ejemplo a la SEQ ID NO: 13. El derivado del dominio bisagra de una IgG1 humana corresponde típicamente a un dominio bisagra, en donde el residuo de cisteína en la quinta posición de la secuencia bisagra se ha sustituido por otro residuo. De hecho, dicha mutación da como resultado la restauración de la estructura típica de las otras subclases de IgG. Como ejemplo de dicho derivado, puede citarse la SEQ ID NO: 14.

La SEQ ID NO: 13	EPKSCDKTHTCPPCP
La SEQ ID NO: 14	EPKSSDKTHTCPPCP

Los dominios bisagra de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana son bien conocidos por el experto en la técnica y corresponden como ejemplo a la SEQ ID NO: 15 para IgG3. Los dominios bisagra truncados de una IgG3 humana también son bien conocidos por el experto en la técnica y se seleccionan del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16 a 19, preferentemente la SEQ ID NO: 19.

La SEQ ID NO: 15	ELKTPPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCP
La SEQ ID NO: 16	ELKTPPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCP
La SEQ ID NO: 17	ELKTPPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
La SEQ ID NO: 18	EPKSCDTPPPCPRCP
La SEQ ID NO: 19	ELKTPPLGDTTHTCPRCP

De acuerdo con una tercera modalidad preferida, el anticuerpo de la invención comprende un dominio bisagra de una IgG1 humana o un derivado de la misma, preferentemente dicho dominio tiene la secuencia de SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 14.

Todavía preferentemente, dicho anticuerpo se selecciona del grupo que comprende 301.14a, 301.14b, 301.15, 301.15b, 301.20 y 301.21.

De acuerdo con una cuarta modalidad preferida, el anticuerpo de la invención comprende un dominio bisagra de un IgG2, IgG3, IgG4 humano, un dominio bisagra de un IgG1 humano en donde el residuo de cisteína en la quinta posición de la secuencia bisagra se ha sustituido por otro residuo, o una bisagra truncada de un IgG3 humano, preferentemente dicho dominio es de un IgG3 humano y tiene la secuencia seleccionada en el grupo que consiste de la SEQ ID NO: 15 a la SEQ ID NO: 19, y con la máxima preferencia la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 19.

Todavía preferentemente, dicho anticuerpo se selecciona del grupo que comprende 301.16, 301.17, 301.18 y 301.19.

De acuerdo con una quinta modalidad preferida, el anticuerpo de la invención comprende:

- 1) una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9,
- 2) una cadena pesada que comprende:

- los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 10,
- una secuencia de aminoácidos que corresponde a CH1 humana y dominios bisagra seleccionados en el grupo que comprende o que consiste en:

Secuencia	Anticuerpo	Figura
La SEQ ID NO: 20	301.14a	2
La SEQ ID NO: 21	301.14b	3
La SEQ ID NO: 22	301.15	4
La SEQ ID NO: 34	301.15b	9
La SEQ ID NO: 23	301.16	5
La SEQ ID NO: 24	301.17	6
La SEQ ID NO: 25	301.18	7
La SEQ ID NO: 26	301.19	8
La SEQ ID NO: 31	301.20	10
La SEQ ID NO: 32	301.21	11

De acuerdo con una modalidad preferida aún, el anticuerpo de la invención se selecciona entre los anticuerpos 301.14b, 301.15, 301.18 y 301.19.

De hecho, estos anticuerpos muestran inesperadamente una actividad proapoptótica mayor que la del anticuerpo original.

Preferentemente aún, el anticuerpo de la invención es el anticuerpo 301.15.

De hecho, este anticuerpo es el único que muestra una cooperatividad de unión como el anticuerpo original.

Preferentemente, la introducción de un residuo de cisteína dentro de los anticuerpos de la invención ya sea por un dominio CH1 mutado de una IgG1 humana que presente un residuo de cisteína en la posición 133 o 134 de su secuencia, o por un dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana, no libera ningún grupo tiol libre previamente unido a otro residuo de cisteína.

Los anticuerpos de la invención abarcan inmunoconjugados.

Como se usa en la presente, el término "inmunoconjugado" se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos un anticuerpo quimérico o un fragmento funcional del mismo, unido a una segunda molécula, preferentemente un agente citotóxico o un radioisótopo. Preferentemente, dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo se une a dicha segunda molécula por enlace covalente.

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

En una modalidad particular, el anticuerpo de la invención es un inmunoconjugado en donde dicho inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo que comprende un dominio CH1 y un agente citotóxico.

En otra modalidad particular, el anticuerpo de la invención es un inmunoconjugado en donde dicho inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo que comprende un dominio CH1 y un radioisótopo.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo como se describe en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable para uso en terapia.

Dicha composición es particularmente útil para tratar el cáncer que expresa el gangliósido GD2 O-acetilado.

En una modalidad, la invención se refiere a una composición farmacéutica para usar en el tratamiento del cáncer que expresa el gangliósido GD2 O-acetilado, tal como neuroblastomas, melanomas, glioblastomas, cánceres de pulmón de células pequeñas, cánceres de mama y cánceres de células madre cancerosas.

Dicha composición puede estar en cualquier forma farmacéutica adecuada para la administración a un paciente, que incluye, pero no se limita a, soluciones, suspensiones, polvos liofilizados, cápsulas y comprimidos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además cualquier diluyente, excipiente o auxiliar farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la invención puede formularse para inyección, por ejemplo, inyección local, administración transmucosa, inhalación, administración oral y, más generalmente, cualquier formulación que el experto en la técnica considere apropiada para lograr la terapia deseada.

El anticuerpo de la invención está contenido en dicha composición farmacéutica en una cantidad efectiva para lograr el propósito pretendido y en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

Más específicamente, una dosis terapéuticamente eficaz significa una cantidad de un compuesto efectiva para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas del sujeto que padece cáncer.

En dependencia de la aplicación prevista, el anticuerpo quimérico de la invención puede comprender además constituyentes adicionales. Como ejemplo, el anticuerpo quimérico de la invención puede corresponder a un inmunoconjugado.

La solicitud también describe un método para tratar el cáncer que expresa el gangliósido GD2 O-acetilado que comprende proporcionar a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica como se describe en la presente descripción, que comprende al menos un anticuerpo quimérico como se describe en la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término "paciente" se refiere a un mamífero, preferentemente a un ser humano.

Un paciente que lo necesite corresponde a un paciente que padece un cáncer que expresa el gangliósido GD2 O-acetilado.

5 Dichos cánceres que expresan el gangliósido GD2 O-acetilado se seleccionan del grupo que comprende neuroblastomas, melanomas, glioblastomas, cánceres de pulmón de células pequeñas, cánceres de mama y cánceres de células madre cancerosas.

10 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método para aumentar la eficacia terapéutica del anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, o un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo que comprende un dominio CH1, dicho anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende tres regiones complementarias de cadena ligera (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

15 i) la CDR1 de cadena ligera: QSLLKNNGNTFL (SEQ ID NO:1);

ii) la CDR2 de cadena ligera: KVS;

20 iii) la CDR3 de cadena ligera: SQSTHIPYT (SEQ ID NO:2); y

cuatro regiones marco de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina y un dominio CL kappa (κ) humano; y

25 b) una cadena pesada que comprende tres regiones complementarias de cadena pesada (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

i) la CDR1 de cadena pesada: EFTFTDYY (SEQ ID NO: 3);

30 ii) la CDR2 de cadena pesada: IRNRANGYTT (SEQ ID NO: 4);

iii) la CDR3 de cadena pesada: ARVSNWAFDY (SEQ ID NO: 5); y

cuatro regiones marco de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina, y:

35 1) los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana, y

2) un dominio CH1 de una IgG1 humana (CH1 γ 1),

40 dicho método comprende la etapa de sustituir el aminoácido en la posición 133 o 134 de la SEQ ID NO: 29 del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat y otros, por un residuo de cisteína, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o de sustituir dicho dominio CH1 γ 1 humano por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1 γ 2), IgG3 (CH1 γ 3) o IgG4 (CH1 γ 4) humana.

45 Dicho método de aumentar la eficacia terapéutica comprende aumentar la actividad proapoptótica de dicho anticuerpo.

50 En una primera modalidad preferida, el método de la invención comprende la etapa de mutar el dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, para restaurar el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de otras subclases de IgG.

El dominio CH1 de una IgG1 humana es bien conocido por el experto en la técnica.

55 El dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado puede mostrarse en la figura 1.

60 Ventajosamente, la etapa de sustituir el aminoácido en la posición 133 o 134 de la SEQ ID NO: 29 del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat y otros, por un residuo de cisteína, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, se realiza mediante:

a) aislar una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicha secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente la cadena pesada del anticuerpo;

65

b) mutar un codón del dominio CH1 γ 1 de dicho anticuerpo, preferentemente al mutar el codón que codifica la posición 133 o 134 de dicho dominio CH1 para codificar el residuo de aminoácido cisteína (C) para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) proporcionar a la secuencia de ácido nucleico mutada elementos de expresión operables;

d) coexpresar el ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un huésped adecuado para proporcionar de esta manera un anticuerpo IgG1 humano mutado que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, o a un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado; y

e) opcionalmente, aislar el anticuerpo mutado o el fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo.

En una segunda modalidad preferida, el método de la invención comprende la etapa de sustituir dicho dominio CH1 de una IgG1 humana por el dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

El dominio CH1 de una IgG2, IgG3 e IgG4 humana son bien conocidos por el experto en la técnica. Como ejemplo, el dominio CH1 de una IgG3 humana corresponde a la SEQ ID NO: 12.

Ventajosamente, la etapa de sustituir el dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado por el dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana se realiza mediante:

a) aislar una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicha secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente la cadena pesada del anticuerpo;

b) sustituir dicho dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al ácido nucleico gangliósido GD2 O-acetilado por una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio CH1 de un IgG2, IgG3 o IgG4 humano para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) proporcionar a la secuencia de ácido nucleico mutada elementos de expresión operables;

d) coexpresar el ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un huésped adecuado para proporcionar de esta manera un anticuerpo IgG1 humano mutado que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, o a un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado; y

e) opcionalmente, aislar el anticuerpo mutado o el fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo.

En una modalidad preferida aún, el método de la invención comprende además la etapa de mutar el dominio bisagra de IgG1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado en donde el residuo de cisteína en la quinta posición de la secuencia bisagra se ha sustituido por otro residuo, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre el dominio bisagra y el dominio CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o de sustituir el dominio bisagra IgG1 humano de dicho anticuerpo por el dominio bisagra de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana, o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19.

El dominio bisagra de una IgG1 humana es bien conocido por el experto en la técnica y corresponde como ejemplo a la SEQ ID NO: 13.

Como se usa en la presente, la etapa de "mutar el dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, para restaurar el emparejamiento entre los dominios bisagra y CH2 que es típico de otras subclases de IgG", se refiere a un dominio bisagra de IgG1 humana de dicho anticuerpo, en donde el residuo de cisteína en la quinta posición de la secuencia de la proteína bisagra se ha sustituido por otro residuo, preferentemente por una serina. De hecho, dicha mutación da como resultado la restauración de la estructura típica de IgG. Como ejemplo de dicho derivado, puede citarse la SEQ ID NO: 14.

Ventajosamente, la etapa de mutar la bisagra humana de dicho anticuerpo que restaura el emparejamiento entre la bisagra y el CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas se realiza mediante:

a) aislar una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicha secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente la cadena pesada del anticuerpo;

b) mutar el codón que codifica el residuo de aminoácido cisteína (C) en la posición 5 de dicho dominio bisagra para codificar otro residuo de aminoácido, preferentemente un residuo de serina, para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) proporcionar a la secuencia de ácido nucleico mutada elementos de expresión operables;

d) coexpresar el ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un huésped adecuado, y proporcionar de esta manera un anticuerpo IgG1 humano mutado que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, o a un fragmento de unión a antígeno; y

e) opcionalmente, aislar el anticuerpo mutado o el fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo.

Los dominios bisagra de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana son bien conocidos por el experto en la técnica y corresponden como ejemplo a la SEQ ID NO: 15 para IgG3. Los derivados de IgG3 humana también son bien conocidos por el experto en la técnica y corresponden como ejemplo a la SEQ ID NO: 16 a 19, preferentemente la SEQ ID NO: 19.

Aún más ventajosamente, la etapa de sustituir el dominio bisagra IgG1 humano de dicho anticuerpo por el dominio bisagra de un IgG2, IgG3 o IgG4 humano, o un dominio bisagra truncado de un IgG3 humano seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO:19, se realiza mediante:

a) aislar una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicha secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente la cadena pesada del anticuerpo;

b) sustituir el dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del gangliósido GD2 O-acetilado por una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio bisagra de un IgG2, IgG3, IgG4 humano o un dominio bisagra truncado de un IgG3 humano seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19 para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;

c) proporcionar a la secuencia de ácido nucleico mutada elementos de expresión operables;

d) coexpresar el ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un huésped adecuado para proporcionar de esta manera un anticuerpo IgG1 humano mutado que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, o a un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado; y

e) opcionalmente, aislar el anticuerpo mutado o el fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo.

Otras modalidades y ventajas de la presente invención se ilustran en los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

1 - Actividad proapoptótica del anticuerpo anti-OAcGD2 *in vitro*

En una primera etapa, se ha diseñado el anticuerpo quimérico anti-OAcGD2, c8B6, de 8B6 al sustituir sus regiones constantes por la de una IgG1,κ humana. Sus secuencias se representan en la figura 1 (SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:28).

La estructura de este anticuerpo comprende 2 enlaces disulfuro intramoleculares en cadena ligera (Cys23-Cys93 y Cys139-Cys199), y 4 enlaces disulfuro intramoleculares en cadena pesada (Cys22-Cys98, Cys146-Cys202, Cys263-Cys323 y Cys369-Cys427). Los residuos de cisteína implicados en los enlaces disulfuro intracatenarios se indican con una estrella (*). Toda la estructura está estabilizada por 3 enlaces disulfuro intermoleculares: la cadena ligera está conectada a la cadena pesada por un enlace disulfuro entre el último residuo de cisteína de la cadena ligera y el residuo de cisteína de la región bisagra superior (Cys219-Cys222), y las cadenas pesadas están conectadas por 2 enlaces disulfuro que conectan la cisteína en la bisagra media (Cys228-Cys228 y Cys231-Cys231). Los residuos de cisteína implicados en los enlaces disulfuro intercatenarios se indican con una flecha (†).

El 8B6 LCVR se clona con NotI-KasI en un vector pEvi para fusionarlo con el dominio CL de una IgG1 humana.

El dominio 8B6 HCVR se clona NotI-NheI en un vector pEvi' para fusionarse con el dominio constante de la cadena pesada de una IgG1 humana.

Luego, las células CHO K1 se cotransfectan con ambos vectores.

Después de la transfección, las células CHO K1 se mantienen en un medio sin suero durante varios días.

- 5 Cada día, el medio de cultivo se cosecha y se congela a -80 °C. Se añade un nuevo medio a las células transfectadas hasta que la viabilidad celular sea menor que 70-80 %.

Los medios de cultivo cosechados se agrupan y el anticuerpo se purifica mediante el uso de la proteína A inmovilizada en una matriz de sefarosa.

- 10 La producción de c8B6 en CHO se analizó por electroforesis tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Los resultados han demostrado que, en condiciones no reductoras, el anticuerpo c8B6 mostró una banda a 150 kD que corresponde al anticuerpo completo. Mientras que, en condiciones reductoras, se observó una banda a 50 kD para HC y una banda a 25 kD para LC. La filtración en gel en una Columna SUPERDEX mostró un perfil cromatográfico con un pico principal (99,0 % para el grado de pureza) a 12,3 ml que corresponde a 150 kD. Finalmente, el rendimiento de producción del c8B6 quimérico después de la purificación en una columna de proteína A fue de aproximadamente 315 mg/l de sobrenadante.

- 20 La unión del anticuerpo a su objetivo se confirmó mediante citometría de flujo en células IMR5 que expresaban gangliósido GD2 O-acetilado. La unión se reveló mediante una IgG antihumana de cabra conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Estos experimentos han confirmado la funcionalidad de este anticuerpo, que se une a GD2 O-acetilado.

Luego, se evaluó la citotoxicidad directa del anticuerpo c8B6 mediante ensayos MTT.

- 25 En estos ensayos, 1×10^4 de células IMR5, SUM159PT o H187 se incuban 24 h a 37 °C en una microplaca de 96 pocillos. Se añadieron anticuerpos de 80-0,15 µg/ml y se incubaron 24 h a 37 °C. Luego se añadieron cincuenta µg de MTT a cada pocillo y se incubaron al menos 4 h a 37 °C, antes de solubilizar las células con SDS al 10 % e incubar O.N. a 37 °C. Luego se leyó la absorbancia a 570 y 650 nm. La absorbancia del producto a 650 nm se restó de la absorbancia a 570 nm (Abs570-Abs650) para calcular la conversión total del medio de contraste. Cuatro pocillos de control con células tratadas con 20 µg de etopósido proporcionan el blanco para la absorbancia que da el 0 % de viabilidad. La inhibición de la viabilidad (%) se expresó como un porcentaje con relación a las células no tratadas y cada valor se representa como la media $\pm$ SEM por cuadruplicado.

- 35 Los resultados han demostrado que el anticuerpo c8B6 ha perdido la citotoxicidad directa de 8B6 después de la etapa de quimerización al pasar de dominios constantes de IgG3 murina a dominios constantes de IgG1 humana. Además, el anticuerpo perdió aún más las propiedades de cooperatividad de la IgG3 8B6 parental.

- 40 Finalmente, muchos experimentos que probaron diferentes formas de quimerización solo restauraron poca actividad proapoptótica y no se observó cooperatividad en la unión.

Sorprendentemente, las modificaciones específicas del dominio constante CH1 para la quimerización resultan en grandes cambios para la actividad proapoptótica.

- 45 Estos resultados se obtuvieron con los anticuerpos 301.14a, 301.14b, 301.15, 301.15b, 301.16, 301.17, 301.18, 301.19, 301.20 y 301.21 que se diseñaron sobre la base de las construcciones previas.

- 50 El anticuerpo 301.14a corresponde a un CH1γ1 humano mutado (mutación S133C subrayada) con el dominio Bisagra γ1 humano como se representa en la figura 2 (SEQ ID NO:20). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

- 55 El anticuerpo 301.14b corresponde a un CH1γ1 humano mutado (mutación S133C subrayada) con un dominio Bisagra γ1 humano mutado (mutación subrayada correspondiente a la sustitución de la cisteína 222 por un residuo de serina, C222S) como se representa en la figura 3 (SEQ ID NO:21). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

- 60 El anticuerpo 301.15 corresponde a un CH1γ3 humano (que sustituye a su primo CH1γ1) con el dominio Bisagra γ1 humano como se representa en la figura 4 (SEQ ID NO:22). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

- 65 El anticuerpo 301.15b corresponde a un CH 1 13 humanos (que sustituye a su primo CH1γ1) con un dominio Bisagra γ1 humano mutado (la mutación subrayada que corresponde a la sustitución de la cisteína 222 por un residuo de serina, C222S) como se representa en la figura 9 (SEQ ID NO: 34). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El anticuerpo 301.16 corresponde a un CH1 γ 1 humano mutado (mutación S133C subrayada) con el dominio Bisagra 13 humano (que sustituye a su primo Bisagra γ 1) como se representa en la figura 5 (SEQ ID NO:23). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El anticuerpo 301.17 corresponde a un CH1 γ 3 humano (que sustituye a su primo CH1 γ 1) con el dominio Bisagra γ 3 humano (que sustituye a su primo Bisagra γ 1) como se representa en la figura 6 (SEQ ID NO:24). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El anticuerpo 301.18 corresponde a un CH1 γ 1 humano mutado (mutación S133C subrayada) con un dominio Bisagra 13 humano acortado (17 aminoácidos) como se representa en la figura 7 (SEQ ID NO:25). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El anticuerpo 301.19 corresponde a un CH1 γ 3 humano (que sustituye a su primo CH1 γ 1) con un dominio Bisagra 13 humano acortado (17 aminoácidos) como se representa en la figura 8 (SEQ ID NO:26). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El anticuerpo 301.20 corresponde a un CH1 γ 2 humano (que sustituye a su primo CH1 γ 1) con el dominio Bisagra γ 1 humano como se representa en la figura 10 (SEQ ID NO: 31). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El anticuerpo 301.21 corresponde a un CH1 γ 4 humano (que sustituye a su primo CH1 γ 1) con el dominio Bisagra γ 1 humano como se representa en la figura 11 (SEQ ID NO: 32). Los otros dominios constantes corresponden a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 (SEQ ID NO: 9) y el dominio CL kappa (SEQ ID NO: 8).

El control mulgG3 corresponde a un 8B6 IgG3 murino, en donde CH1 IgG3 corresponde a la SEQ ID NO: 33, en donde el residuo de cisteína en la posición 134 está sustituido por un residuo de serina y el residuo de serina en la posición 224 está sustituido por un residuo de cisteína.

La SEQ ID NO: 33	ATTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVKWN Y GALSSGVRTVSSVLQSGFYSLSSLVTPSSTWPSQTVICNVAHP ASKTELIKRIEPRIPKCTPPGSSCP
------------------	---

La unión de dichos anticuerpos al gangliósido GD2 O-acetilado se confirmó como previamente.

Luego, se determinaron las actividades proapoptóticas potenciales de dichos anticuerpos como se mencionó previamente.

Los resultados se resumen en las siguientes tablas, en donde el porcentaje de lisis es el obtenido para una concentración de anticuerpo de 80 μ g/ml.

Citotoxicidad directa de anticuerpos anti-OacGD2 301.14a, 301.14b, 301.15, 301.16, 301.17, 301.18 y 301.19 sobre células IMR5:

Construcción	Media +/- SEM de n=2 experimentos		Afinidad (Eq)
	EC ₅₀ (μ g/ml)	% de lisis máxima	Kd (nM)
8B6	10,0 $\pm$ 1,8	33,3 $\pm$ 5,6	46,9 $\pm$ 15,0
c8B6	14,7 $\pm$ 16,6	7,3 $\pm$ 5,4	208,3 $\pm$ 90,9
301.14a	6,5 $\pm$ 0,3	20,2 $\pm$ 7,4	ND
301.14b (n=1)	1,0	33,8	103,6 $\pm$ 22,5
301.15	3,6 $\pm$ 2,0	45,0 $\pm$ 13,9	161,9 $\pm$ 42,0
301.16	2,1 $\pm$ 2,0	29,2 $\pm$ 17,3	ND
301.17	3,2 $\pm$ 0,8	20,8 $\pm$ 3,0	ND
301.18	8,5 $\pm$ 0,6	31,0 $\pm$ 1,7	63,9 $\pm$ 8,6

(continuación)

Construcción	Media +/- SEM de n=2 experimentos		Afinidad (Eq)
	EC ₅₀ (µg/ml)	% de lisis máxima	Kd (nM)
301.19	7,6 ± 1,4	37,5 ± 0,5	54,5 ± 6,2

Los resultados muestran que, inesperadamente, los anticuerpos quiméricos que comprenden un CH1γ1 humano mutado o un CH1γ3 humano tienen una actividad proapoptótica, lo que significa que la pérdida de citotoxicidad directa podría deberse a la estructura de la IgG1 humana. Además, todos estos anticuerpos muestran una EC₅₀ mayor que la del anticuerpo inicial 8B6.

Los resultados también han mostrado que las construcciones que dieron el efecto citotóxico más alto en términos de % de lisis máximo corresponden (i) a la fusión de CH1γ3 humano y Bisagra γ1 humano (construcción 301.15) o (ii) a la fusión de CH1γ1 humano (mutado en S133C) o CH1γ3 humano y Bisagra γ3 humano acortado (construcciones 301.18 y 301.19). Para estos 2 últimos, se observó un aumento de la afinidad en comparación con el c8B6 original. Por último, y sorprendentemente, aún, el anticuerpo 301.15 fue el único que presentó un perfil agregativo en las curvas de competición que corresponde a una cooperatividad de unión restaurada.

Citotoxicidad directa de los anticuerpos anti-OacGD2 301.15b, 301.20 y 301.21 sobre células IMR5, SUM159PT y H187:

Línea celular	Anticuerpo	% de lisis máx. (80 µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)
IMR5	301.15b	58,67	2,53
	301.20	79,92	11,60
	301.21	60,88	26,12
SUM159PT	8B6	64,76	25,42
	301.14b	63,99	1,92
	301.15	75,53	19,19
	c8B6	0,00	ND
H187	8B6	68,46	3,30
	301.14b	65,42	2,27
	301.15	70,96	7,72
	c8B6	0,00	ND

Los resultados muestran que, inesperadamente, los anticuerpos quiméricos que comprenden un CH1γ2 o CH1γ4 humano tienen una actividad proapoptótica sobre las células IMR5, lo que significa que la pérdida de citotoxicidad directa podría deberse a la estructura de la IgG1 humana. Además, los anticuerpos quiméricos que comprenden un dominio CH1γ3 humano y un dominio Bisagra γ1 humano mutado (mutación subrayada que corresponde a la sustitución de la cisteína 222 por un residuo de serina, C222S) tienen una actividad proapoptótica sobre las células IMR5.

Los resultados también han demostrado que las construcciones correspondientes a la fusión de CH1 γ1 humano (mutado en S133C) y un dominio Bisagra γ1 humano mutado (mutación subrayada que corresponde a la sustitución de la cisteína 222 por un residuo de serina, C222S) (construcción 301.14b) o a la fusión de CH1γ3 humano y Bisagra γ1 humano (construcción 301.15) tienen actividad proapoptótica tanto sobre células SUM159PT como H187.

La citotoxicidad directa de diferentes anticuerpos también se evaluó mediante el ensayo de yoduro de propidio.

En este ensayo, se sembraron 150 000 células IMR5 en placas de 24 pocillos durante 24 h a 37 °C y luego se trataron durante 24 h a 37 °C con 40 µg/ml de cada anticuerpo. Posteriormente, las células muertas se marcaron con yoduro de propidio (12,5 µg/ml). Todas las muestras se analizaron por citometría de flujo en un LSRII FACS (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.).

Los resultados se resumen en la siguiente tabla y se ilustran en la figura 12.

	% de células muertas	SEM
PBS	20,2	1,00
c8B6 (301.3)	22,6	1,79
8B6 (301.4)	67,7	1,90
301.14b	46,8	2,61
301.15	48,0	0,77
control hulG1	20,2	0,98
control mulG3	22,4	1,59

Los resultados confirmaron que las construcciones correspondientes a la fusión de CH1 γ 1 humano (mutado en S133C) y un dominio Bisagra γ 1 humano mutado (mutación subrayada que corresponde a la sustitución de la cisteína 222 por un residuo de serina, C222S) (construcción 301.14b) o a la fusión de CH1 γ 3 humano y Bisagra γ 1 humano (construcción 301.15) tienen actividad proapoptótica sobre las células IMR5. Simultáneamente, los resultados confirman que una mutación en la IgG3 8B6 murina para mimetizar la estructura de la IgG1 resulta en una pérdida de actividad proapoptótica.

La reconstitución del emparejamiento entre la CH1 y la cadena ligera, típica de los anticuerpos no IgG1, podría restaurar la actividad proapoptótica. Dicha reconstitución podría obtenerse al restaurar la cisteína CH1 típica de las subclases no IgG1 o al sustituir un dominio CH1 no IgG1.

En conclusión, los inventores tuvieron éxito en la quimerización del anticuerpo 8B6 con una actividad proapoptótica mantenida, cuya actividad proapoptótica incluso aumenta para dos anticuerpos, uno de los cuales muestra también una unión cooperativa como el anticuerpo original.

2 - Eficiencia del anticuerpo anti-OAcGD2 *in vivo*

Modelo de neuroblastoma murino

Se adquirieron ratones NOD/SCID, de 5 semanas de edad, de CHARLES RIVER.

Los tumores IMR5 de neuroblastoma humano se cultivaron en ratones NOD-SCID inmunodeficientes. Brevemente, los ratones se inyectaron por vía subcutánea con células tumorales (1×10^6 células IMR5) en el flanco derecho. Luego se midió el crecimiento del tumor subcutáneo después de la implantación del tumor mediante el uso de la fórmula [Volumen $\text{mm}^3 = (\text{largo}) \times (\text{ancho}^2) \times 0,5$]. En ratones NOD/SCID portadores de neuroblastoma humano IMR5, se administró anticuerpo (500 μg /ratón) por vía iv cuando el volumen del tumor era igual a 0,1 cm^3 .

Los ratones recibieron mAb 8B6 (mulG3), o mAb c.8B6 (hulG1), o mAb hulG1 doblemente mutado, o hulG1 CH1 sustituido por hulG3 CH1.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo que comprende un dominio CH1, que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicho anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende tres regiones complementarias de cadena ligera (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

- i) la CDR1 de cadena ligera: QSLLKNNGNTFL (SEQ ID NO:1);
- ii) la CDR2 de cadena ligera: KVS;
- iii) la CDR3 de cadena ligera: SQSTHIPYT (SEQ ID NO:2); y

cuatro regiones marco de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina y un dominio CL kappa (κ) humano; y

b) una cadena pesada que comprende tres regiones complementarias de cadena pesada (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

- i) la CDR1 de cadena pesada: EFTFTDYY (SEQ ID NO: 3);
- ii) la CDR2 de cadena pesada: IRNRANGYTT (SEQ ID NO: 4);
- iii) la CDR3 de cadena pesada: ARVSNWAFDY (SEQ ID NO: 5); y

cuatro regiones marco de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina, y:

- 1) los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana, y
- 2) un dominio CH1 de una IgG1 humana, en donde el aminoácido en la posición 133 o 134 de la SEQ ID NO:29, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat y otros, se ha sustituido por un residuo de cisteína, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o un dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera (LCVR) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y/o la región variable de cadena pesada (HCVR) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

3. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio CL kappa (κ) humano que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 8.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho anticuerpo tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho anticuerpo comprende los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana que tiene la secuencia de SEQ ID NO:10.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio CH1 de una IgG1 humana, en donde el aminoácido en la posición 133 o 134 de la SEQ ID NO:29, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat y otros, se ha sustituido por un residuo de cisteína, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio CH1 de una IgG3 humana tal como la SEQ ID NO:12.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho anticuerpo comprende, además un dominio bisagra de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humana, un dominio bisagra de una IgG1 humana en donde el residuo de cisteína en la quinta posición de la bisagra la secuencia se ha sustituido por otro residuo, o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18 y la SEQ ID NO:19.

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho dominio bisagra se selecciona del grupo que comprende la SEQ ID NO:13 a la SEQ ID NO:19.

10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo comprende:

- 1) una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y
- 2) una cadena pesada que comprende:

- los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana que tiene la secuencia de SEQ ID NO:10, y

- una secuencia de aminoácidos que corresponde a CH1 humana y dominios bisagra seleccionados en el grupo que comprende o que consiste en:

Secuencia	anticuerpo	Figura
SEQ ID NO:20	301.14a	2
SEQ ID NO:21	301.14b	3
SEQ ID NO:22	301.15	4
SEQ ID NO:34	301.15b	9
SEQ ID NO:23	301.16	5
SEQ ID NO:24	301.17	6
SEQ ID NO:25	301.18	7
SEQ ID NO:26	301.19	8
SEQ ID NO:31	301.20	10
SEQ ID NO:32	301.21	11

11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a CH1 humano y dominios bisagra seleccionados del grupo que consiste en la SEQ ID NO:21 (301.14b), la SEQ ID NO:22 (301.15), la SEQ ID NO:25 (301.18) y la SEQ ID NO:26 (301.19), preferentemente la SEQ ID NO:22 (301.15).

12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho anticuerpo es un inmunoconjugado.

13. Una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un portador farmacéuticamente aceptable.

14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 para uso en el tratamiento del cáncer que expresa el gangliósido GD2 O-acetilado tal como neuroblastomas, melanomas, glioblastomas, cánceres de pulmón de células pequeñas, cánceres de mama y cánceres de células madre cancerosas.

15. Un método para aumentar la eficacia terapéutica de un anticuerpo, o un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo que comprende un dominio CH1, que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicho anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende tres regiones complementarias de cadena ligera (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

- i) la CDR1 de cadena ligera: QSLLKNNNGNTFL (SEQ ID NO:1);
- ii) la CDR2 de cadena ligera: KVS;
- iii) la CDR3 de cadena ligera: SQSTHIPYT (SEQ ID NO:2); y

cuatro regiones marco de cadena ligera de una cadena ligera de inmunoglobulina y un dominio CL kappa (κ) humano; y

b) una cadena pesada que comprende tres regiones complementarias de cadena pesada (CDR) que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

- i) la CDR1 de cadena pesada: EFTFTDYY (SEQ ID NO: 3);
- ii) la CDR2 de cadena pesada: IRNRANGYTT (SEQ ID NO: 4);
- iii) la CDR3 de cadena pesada: ARVSNWAFDY (SEQ ID NO: 5); y

cuatro regiones marco de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina, y:

- 1) los dominios CH2 y CH3 de una IgG1 humana, y
- 2) un dominio CH1 de una IgG1 humana (CH1 γ 1),

dicho método comprende la etapa de sustituir el aminoácido en la posición 133 o 134 de la SEQ ID NO:29 del dominio CH1 γ 1 humano de dicho anticuerpo, de acuerdo con el índice EU como se establece en Kabat y otros, por un residuo de cisteína, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es

típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o de sustituir dicho dominio CH1γ1 humano por el dominio CH1 de una IgG2 (CH1γ2), IgG3 (CH1γ3) o IgG4 (CH1γ4) humana.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde aumentar la eficacia terapéutica comprende aumentar la actividad proapoptótica de dicho anticuerpo.

17. El método de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16, en donde la etapa de mutar el dominio CH1γ1 humano de dicho anticuerpo que restaura el emparejamiento entre los dominios CH1 y CL que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4, se realiza mediante:

- a) aislar una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicha secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente la cadena pesada del anticuerpo;
- b) mutar un codón del dominio CH1γ1 de dicho anticuerpo, preferentemente mutar el codón que codifica el residuo de aminoácido en la posición 133 o 134 de dicho dominio CH1, para codificar el residuo de aminoácido cisteína (C), para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;
- c) proporcionar a la secuencia de ácido nucleico mutada elementos de expresión operables;
- d) coexpresar el ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un huésped adecuado, y proporcionar de esta manera un anticuerpo IgG1 humano mutado que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, o a un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado; y
- e) opcionalmente, aislar el anticuerpo mutado o el fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo.

18. El método de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16, en donde la etapa de sustituir el dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado por el dominio CH1 de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana se realiza mediante:

- a) aislar una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicha secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente la cadena pesada del anticuerpo;
- b) sustituir dicho dominio CH1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al ácido nucleico gangliósido GD2 O-acetilado por una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio CH1 de un IgG2, IgG3 o IgG4 humano para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;
- c) proporcionar a la secuencia de ácido nucleico mutada elementos de expresión operables;
- d) coexpresar el ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un huésped adecuado para proporcionar de esta manera un anticuerpo IgG1 humano mutado que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, o a un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado; y
- e) opcionalmente, aislar el anticuerpo mutado o el fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo.

19. El método de acuerdo con las reivindicaciones 15 a 18, dicho método comprende además la etapa de mutar el dominio bisagra de IgG1 de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado en donde el residuo de cisteína en la quinta posición de la secuencia bisagra se ha sustituido por otro residuo, para restaurar de esta manera el emparejamiento entre la bisagra y el dominio CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas, o de sustituir el dominio bisagra IgG1 humano de dicho anticuerpo por el dominio bisagra de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana, o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18 y la SEQ ID NO:19.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la etapa de mutar la bisagra humana de dicho anticuerpo que restaura el emparejamiento entre la bisagra y el dominio CH2 que es típico de las subclases IgG2, IgG3 e IgG4 humanas se realiza mediante:

- a) aislar una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicha secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente la cadena pesada del anticuerpo;
- b) mutar el codón que codifica el residuo de aminoácido cisteína (C) en la posición 5 de dicho dominio bisagra para codificar otro residuo de aminoácido, preferentemente un residuo de serina, para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;
- c) proporcionar a la secuencia de ácido nucleico mutada elementos de expresión operables;
- d) coexpresar el ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un huésped adecuado, y proporcionar de esta manera un anticuerpo IgG1 humano mutado que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, o a un fragmento de unión a antígeno; y
- e) opcionalmente, aislar el anticuerpo mutado o el fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la etapa de sustituir el dominio bisagra humano IgG1 de dicho anticuerpo por el dominio bisagra de una IgG2, IgG3 o IgG4 humana, o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18 y la SEQ ID NO:19, se realiza mediante:

- a) aislar una secuencia de ácido nucleico que comprende el dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, dicha secuencia de ácido nucleico codifica preferentemente la cadena pesada del anticuerpo;
- b) sustituir el dominio bisagra de un anticuerpo IgG1 humano que se une específicamente a la secuencia de ácido nucleico del gangliósido GD2 O-acetilado por una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio bisagra de una IgG2, IgG3, IgG4 humana o un dominio bisagra truncado de una IgG3 humana seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO:16, la SEQ ID NO:17, la SEQ ID NO:18 y la SEQ ID NO:19 para proporcionar una secuencia de ácido nucleico mutada;
- c) proporcionar a la secuencia de ácido nucleico mutada elementos de expresión operables;
- d) coexpresar el ácido nucleico mutado con una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera del anticuerpo en un huésped adecuado para proporcionar de esta manera un anticuerpo IgG1 humano mutado que se une específicamente al gangliósido GD2 O-acetilado, o a un fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado; y
- e) opcionalmente, aislar el anticuerpo mutado o el fragmento de unión al gangliósido GD2 O-acetilado del mismo.

Secuencia de cadena ligera:

```

      20      40      60
      |      |      |
VL → [DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLL KNNGNTFLHW YLQKSGQSPK LLIYKVSNRL
      80      100     120
      |      |      |
SGVPDRFSGS GSGTYFTLK SRVEAEDLGV YFC*SQSTHIP YTFGGG→CKLE IKRTVAAPSV
      140     160     180
      |      |      |
FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGN*SQESVTE QDSKDSTYSL
      200
      |
      *
SSTLTLSKAD YE*HKHVVYACE VTHQGLSSPV TKSFN↑RGEC

```

Secuencia de cadena pesada:

```

      20      40      60
      |      |      |
VH → [EVKLVESGGG LVLPGDSLRL SCATSEFTFT DYYMTWVRQP PRKALEWLGF IRNRANGYTT
      80      100     120
      |      |      |
EYNPSVKGRF TISRDNSQSI LYLMNTLRT EDSATYYCAR VSNWAFDYWG QGTTTLTVSSA → CH1
      140     160     180
      |      |      |
STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP*AVLQSSG
      200     220     240
      |      |      |
LYSLSSVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKV→EPK SCDKTH↑TCPP C↑PAPELLG→CH2GGP
      260     280     300
      |      |      |
SVFLFPPKPK DTL*MISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
      320     340     360
      |      |      |
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AK→GQPREPQV YTLPPSREEM
      380     400     420
      |      |      |
TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
      440
      |
      *
QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

Figura 1

ASTKGPSVFP LAPCSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV EPKSCDKTHTC**PPCP** APELLGGP

Figura 2

ASTKGPSVFP LAPCSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV EPKSDKTHTC**PPC** PAPELLGGP

Figura 3

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV EPKSCDKTHTC**PPCP** APELLGGP

Figura 4

ASTKGPSVFP LAPCSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV ELKTPLGDTTHT **CPRCP**
EPKSCDT**PPPCPRCP** EPKSCDT**PPPCPRCP** EPKSCDT**PPPCPRCP** APELLGGP

Figura 5

ASTKGPSVFP LAP**C**SRSTSG GTAALG**C**LVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT Y**T**CNVNHKPS NTKVDKRV ELKTPLGDTTHT
CPR**C**P EPK**S**CDTPPP**C**PR**C**P EPK**S**CDTPPP**C**PR**C**P EPK**S**CDTPPP**C**PR**C**P APELLGGP

Figura 6

ASTKGPSVFP LAP**C**SKSTSG GTAALG**C**LVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT Y**I**CNVNHKPS NTKVDKRV ELKTPLGDTTHT **C**PR**C**P
APELLGGP

Figura 7

ASTKGPSVFP LAP**C**SRSTSG GTAALG**C**LVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT Y**T**CNVNHKPS NTKVDKRV ELKTPLGDTTHT **C**PR**C**P
APELLGGP

Figura 8

ASTKGPSVFP LAP**C**SRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV EPK**S**DKTHT CPPCP

Figura 9

ASTKGPSVFP LAP**C**SRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV EPKSCDKTHT CPPCP

Figura 10

ASTKGPSVFP LAP**C**SRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT
VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCP

Figura 11

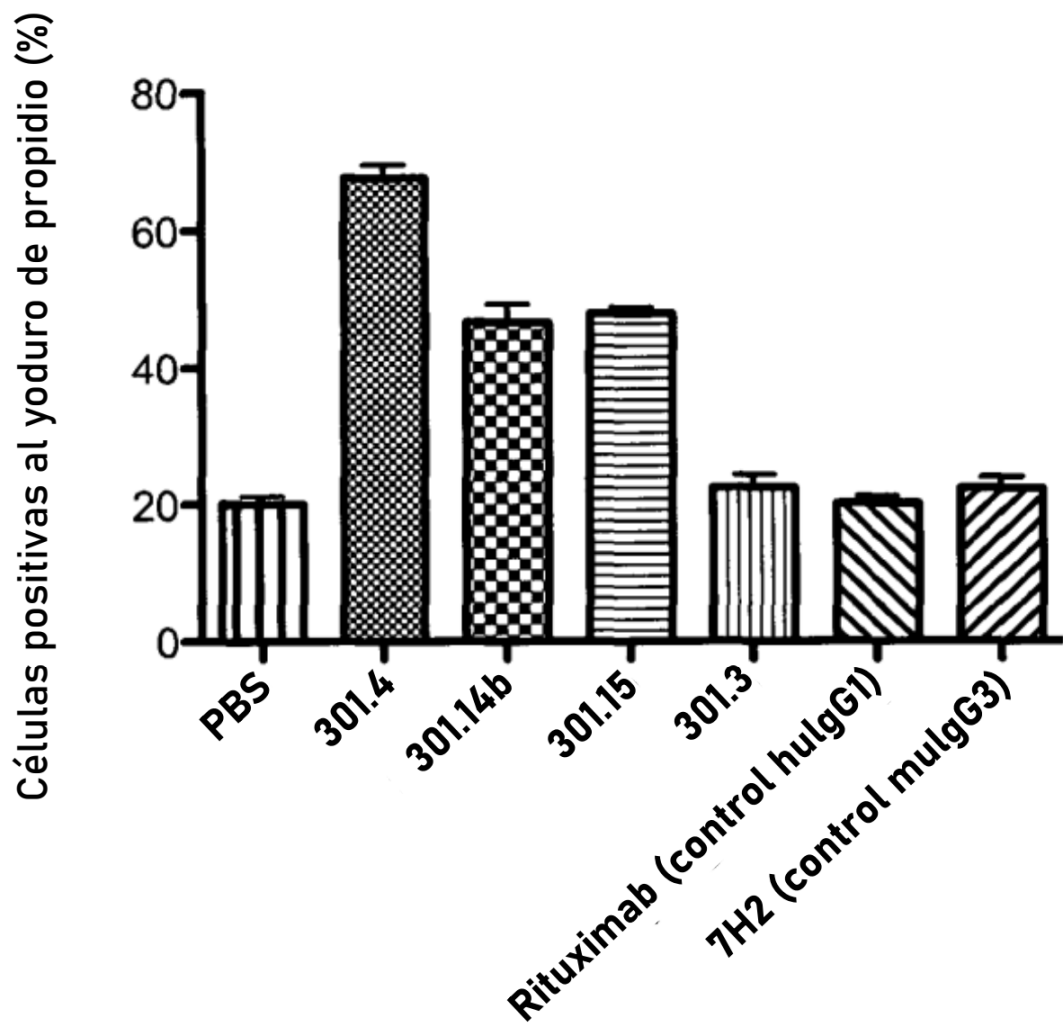


Figura 12