



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 860**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05701002 .7**  
96 Fecha de presentación : **18.01.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1706428**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

54 Título: **Anticuerpos anticancerosos con fijación del complemento reducida.**

30 Prioridad: **22.01.2004 US 538348 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2009**

73 Titular/es: **Merck Patent GmbH**  
**Frankfurter Strasse 250**  
**64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es: **Gillies, Stephen, D.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 330 860 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 anticancerosos con fijación del complemento reducida.

**5 Solicitudes Relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad y el privilegio de la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 60/538.348, presentada el 22 de enero de 2004, cuya descripción completa se incorpora en la presente memoria mediante referencia.

**10 Campo de la invención**

La invención se refiere generalmente al campo de los anticuerpos anticancerosos para orientarse a células tumorales. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-GD2 para orientarse a células tumorales que expresan el glicolípido GD2.

**15 Antecedentes de la invención**

Un método común para tratar el cáncer implica usar anticuerpos para atacar a las células tumorales orientándose específicamente a antígenos asociados con las células tumorales. Un ejemplo específico de este método implica usar anticuerpos anti-GD2 orientados contra GD2, un glicolípido que está altamente expresado en ciertas células tumorales, tales como glioblastoma, melanoma, carcinoma pulmonar microcítico y neuroblastoma. Específicamente, se han probado anticuerpos anti-GD2, tales como 14.18, contra tumores de neuroblastoma y osteosarcoma (Yu *et al.*, J. Clin. Oncol., [1998]; 16: 2169-80), con resultados alentadores. Sin embargo, debido a que GD2 también se expresa en las terminaciones nerviosas, el dolor es un efecto secundario grave del tratamiento con anticuerpos anti-GD2 (Kushner *et al.*, J. Clin. Oncol., [2001]; 19: 4189-94; Frost *et al.*, Cancer, [1997]; 80: 317-33; Yu *et al.*, J. Clin. Oncol., [1998]; 16: 2169-80). Wallace *et al.* (Anesth. Analg. 1997, 85: 794-6) presentan que la infusión de anticuerpo quimérico monoclonal 14.18 (ch14.18) está asociada con el dolor, que sólo puede ser controlado mediante la administración de altas dosis de morfina. Así, existe una necesidad en la técnica de anticuerpos dirigidos contra GD2 que exhiban efectos secundarios reducidos, mientras que mantengan la eficacia para tratar cánceres que expresan el glicolípido GD2.

**Sumario de la invención**

La invención se refiere a proteínas que comprenden restos de anticuerpo en las que las proteínas se unen al glicolípido GD2 e inducen citotoxicidad medida por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), pero tienen fijación del complemento reducida. Cuando se administran a pacientes, los anticuerpos y las proteínas relacionadas de la invención dan como resultado generalmente que los pacientes experimenten niveles de dolor inferiores en comparación con los niveles de dolor generados mediante la administración de las proteínas correspondientes no modificadas de acuerdo con la invención. Como resultado, en algunas modalidades de tratamiento, el sufrimiento de los pacientes se alivia y la calidad de vida se mejora. En otras modalidades de tratamiento, la dosis de la proteína terapéutica de la invención es superior que la de la correspondiente proteína basada en anticuerpo sin las modificaciones de la invención.

En una realización de la invención, se usan proteínas basadas en anticuerpo que comprenden una región Fc y una región variable capaz de unirse a GD2, en las que la región Fc se deriva de IgG, más específicamente EgG1. Las proteínas basadas en anticuerpos de la invención pueden incluir dominios CH1 y/o dominios CL. En una realización adicional, la región variable de la proteína basada en anticuerpo está conectada a una región Fc mediante un enlazador, más específicamente un enlazador polipeptídico. El enlazador polipeptídico puede comprender glicina y/o serina. En una realización, el enlazador tiene la secuencia polipeptídica GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (N° ID SEC: 10). En una realización adicional, la región variable es al menos 60%, 70%, 80% o 90% idéntica a la región variable del anticuerpo 14.18 canónico (Yu *et al.*, J. Clin. Oncol., [1998]; 16: 2169-80; Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° 2003-0157054-A1).

En una realización preferida, la región Fc tiene una modificación que reduce o suprime la fijación del complemento, por ej. con relación a los niveles de ADCC. En esta realización, la región Fc de IgG1 se ha modificado mediante la mutación Lys322Ala. Pueden usarse otras mutaciones que reducen la fijación del complemento, y las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos así como deleciones o inserciones de aminoácidos. En una realización particular, anticuerpos anti-GD2 se expresan en la línea celular derivada de rata YB2/0, lo que da como resultado anticuerpos que tienen una actividad de ADCC superior que anticuerpos anti-GD2 expresados a partir de la mayoría de otras líneas celulares. En resumen, la invención se refiere a los siguientes puntos:

- Un polipéptido que comprende una región variable de un anticuerpo anti-GD2 y una región Fc de una inmunoglobulina (Ig), en donde la región Fc posee una o más sustituciones de residuos de aminoácidos, lo que provoca una disminución o eliminación de la fijación del complemento (CDC).
- Un polipéptido correspondiente, en el que la disminución de CDC es relativa a la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

## ES 2 330 860 T3

- Un polipéptido correspondiente, en el que la región Fc comprende un dominio CH1 y opcionalmente y preferiblemente un dominio CL.
- Un polipéptido correspondiente, en el que la Ig es IgG, preferiblemente IgG 1.
- Un polipéptido correspondiente, en el que la región Fc está modificada al menos en una posición, preferiblemente entre las posiciones 315 y 330, más preferiblemente al menos en la posición 322, lo más preferiblemente solamente en la posición 322.
- Un polipéptido correspondiente, en el que la modificación es una mutación K322A.
- Un polipéptido correspondiente, en el que las regiones variables se derivan de mAb 14.18 humano, que comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC:5.
- El anticuerpo 14.18, que tiene al menos una sustitución de aminoácido en la posición 322, preferiblemente una sustitución K322A.
- Un polipéptido o anticuerpo correspondiente que tiene una actividad de ADCC mejorada, obtenible produciendo dicho polipéptido/anticuerpo en células YB2/0.
- Una molécula de DNA que codifica para un polipéptido o anticuerpo como el especificado anteriormente y en las reivindicaciones.
- Una célula de expresión que comprende dicha molécula de DNA, preferiblemente una YB2/0.
- Una composición farmacéutica que comprende en una cantidad eficaz un polipéptido o anticuerpo como el especificado anteriormente junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- El uso de un polipéptido o anticuerpo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer, seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en neuroblastoma, glioblastoma, osteosarcoma, melanoma, carcinoma pulmonar microcítico, linfoma de células B, carcinoma renal y retinoblastoma.
- Un método para producir un anticuerpo anti-GD2 que tiene una ADCC mejorada y una CDC disminuida o eliminada, comprendiendo el método expresar un polipéptido, que comprende una región variable de un anticuerpo anti-GD2 y una región Fc de una IgG1, en células YB2/0, en donde la región Fc posee al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en la posición 322.
- Un método correspondiente, en el que la sustitución de aminoácido es K322A.
- Un método correspondiente, en el que las regiones variables del polipéptido se derivan de mAb 14.18 humano, que comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de N° ID SEC:5.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos silvestre de la cadena pesada madura de IgG1 de 14.18 humano (N° ID SEC: 1).

La Figura 2 representa una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada madura de IgG1 de 14.18 humano con una mutación K322A (N° ID SEC:5). El residuo de alanina sustituido en 322 está subrayado.

La Figura 3 representa la secuencia de aminoácidos silvestre de la cadena ligera de IgG1 de 14.18 humano (N° ID SEC:2).

La Figura 4 representa una secuencia de ácido nucleico (N° ID SEC:3), con intrones, que codifica una cadena pesada madura de IgG1 de 14.18 humano.

La Figura 5 representa una secuencia de ácido nucleico (N° ID SEC:4), con intrones, que codifica una cadena ligera madura de IgG1 14.18 humano.

La Figura 6 representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos realizado sobre células M-21 que expresan GD2. El eje x indica la concentración de anticuerpo en ng/ml mientras que el eje y indica el porcentaje de lisis de las células diana.

La Figura 7 representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos realizado sobre células LN-299 que expresan GD2. El eje x indica la concentración de anticuerpo en ng/ml mientras que el eje y indica el porcentaje de lisis de las células diana.

## ES 2 330 860 T3

La Figura 8 representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos realizado sobre células EpCAM+ A431 que no expresan GD2. El eje x indica la concentración de anticuerpo en ng/ml mientras que el eje y indica el porcentaje de lisis de las células diana.

5 La Figura 9 representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento realizado sobre células M-21 que expresan GD2. El eje x indica la concentración de anticuerpo en ng/ml mientras que el eje y indica el porcentaje de lisis de las células diana.

10 La Figura 10 representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento realizado sobre células LN-229 que expresan GD2. El eje x indica la concentración de anticuerpo en ng/ml mientras que el eje y indica el porcentaje de lisis de las células diana.

15 La Figura 11 representa la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión madura sFv(VL-VH)-Fc de 14.18 humano (N° ID SEC:9) que es una porción que se une a antígeno sFv conectada a través de un enlazador polipeptídico con la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (N° ID SEC:10) a un fragmento Fc que consiste en los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG1.

20 La Figura 12 representa una secuencia de ácido nucleico que codifica el constructo de anticuerpo sFv(VL-VH)-Fc de 14.18 humano maduro (N° ID SEC:8) de la Figura 10.

### Descripción detallada de la invención

25 El glicolípido GD2 se expresa en una variedad de tipos de tumor, pero esencialmente no se expresa en tejidos normales, con la excepción de alguna expresión en las terminaciones nerviosas. Anticuerpos dirigidos contra el antígeno del glicolípido GD2 se han probado en pacientes de cáncer con algún éxito. Sin embargo, presumiblemente debido a la expresión de GD2 en las neuronas, el dolor es un efecto secundario principal del tratamiento con anticuerpos anti-GD2, y es por consiguiente una toxicidad limitativa de la dosis. La presente invención proporciona anticuerpos anti-GD2 y moléculas relacionadas que inducen menos dolor.

30 Según se usa en la presente memoria, el término glicolípido GD2 o antígeno de GD2 se define como un glicolípido capaz de unión específica a un anticuerpo anti-GD2 según se define en la presente memoria. El término anticuerpo anti-GD2 se define como un anticuerpo capaz de unión específica al glicolípido GD2 antigénico. Según se usa en la presente memoria, se entiende que los términos “unir específicamente” y “unión específica” significan que el anticuerpo tiene una afinidad de unión para un antígeno particular de al menos aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , más preferiblemente, al menos aproximadamente  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , más preferiblemente al menos aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$  y lo más preferiblemente al menos aproximadamente  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ .

40 Según se usa en la presente memoria, se entiende que el término “anticuerpo” significa (i) un anticuerpo intacto (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal), (ii) porciones que se unen a antígeno del mismo, incluyendo, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento (Fab')<sub>2</sub>, un fragmento Fv, un sitio de unión a anticuerpo monocatenario, un sFv, (iii) anticuerpos biespecíficos y porciones que se unen a antígeno de los mismos, y (iv) anticuerpos multiespecíficos y porciones que se unen a antígeno de los mismos. Por otra parte, el término “anticuerpo” abarca cualquiera de un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento (Fab')<sub>2</sub>, un fragmento Fv, un sitio de unión a anticuerpo monocatenario o un fragmento sFv enlazado a un fragmento Fc o cualquier porción de un fragmento Fc. El enlace puede efectuarse a través del uso de secuencias peptídicas enlazadoras conocidas en la técnica. Un anticuerpo de la invención puede ser natural o sintético, tal como un anticuerpo recombinante.

50 Según se usa en la presente memoria, se entiende que el término “inmunoglobulina” significa un polipéptido natural o producido sintéticamente homólogo a un anticuerpo intacto (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal) o un fragmento o una porción del mismo, tal como una porción que se une a antígeno del mismo. La inmunoglobulina de acuerdo con la invención puede ser de cualquier clase, tal como IgA, IgD, IgG, IgE o IgM. Las inmunoglobulinas IgG pueden ser de cualquier subclase, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El término inmunoglobulina también abarca polipéptidos y fragmentos de los mismos derivados de inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas puede ser naturales o producirse sintéticamente, tales como inmunoglobulinas recombinantes.

60 La región constante de una inmunoglobulina se define como un polipéptido natural o producido sintéticamente homólogo a la región C-terminal de la inmunoglobulina, y puede incluir un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio CH4, separadamente o en cualquier combinación. Según se usa en la presente memoria, “porción Fc” abarca dominios derivados de la región constante de un anticuerpo anti-GD2, incluyendo un fragmento, un análogo, una variante, un mutante o un derivado de la región constante. Inmunoglobulinas adecuadas incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y otras clases. La región constante de una inmunoglobulina se define como un polipéptido natural o producido sintéticamente homólogo a la región C-terminal de inmunoglobulina, y puede incluir un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio CH4, separadamente o en cualquier combinación. En la presente invención, la porción Fc incluye típicamente al menos un dominio CH2. Por ejemplo, la porción Fc puede incluir bisagra-CH2-CH3. Alternativamente, la porción Fc puede incluir la totalidad o una porción de la región de bisagra, el dominio CH2 y/o el dominio CH3 y/o el dominio CH4.

El término fragmento variable o Fv, según se usa en la presente memoria, se define como un polipéptido natural o producido sintéticamente homólogo a la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera. Más específicamente, un Fv puede ser un sFv o fragmento variable monocatenario en el que la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera están enlazadas entre sí mediante un resto polipeptídico. Tales secuencias enlazadoras polipeptídicas se conocen en la técnica.

La actividad antitumoral de los anticuerpos se presenta generalmente bien a través de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés, o fijación del complemento) o bien a través de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Estas dos actividades se conocen en la técnica como “funciones efectoras” y están mediadas por anticuerpos, particularmente de la clase IgG. Todas las subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) median en la ADCC y la fijación del complemento en alguna extensión, siendo la IgG1 y la IgG3 las más potentes para ambas actividades (Capítulo 3, Tabla 3 en Paul, *Essential Immunology* 4ª Ed., p. 62). Se cree que la ADCC se presenta cuando receptores de Fc o células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) se unen a la región Fc de anticuerpos unidos a antígeno sobre una superficie celular. La unión al receptor de Fc señala que la célula NK destruye la célula diana. Se cree que la CDC se presenta mediante múltiples mecanismos; un mecanismo se inicia cuando un anticuerpo se une a un antígeno sobre una superficie celular. Una vez que se forma el complejo antígeno-anticuerpo, se cree que la molécula de C1q se une al complejo antígeno-anticuerpo. C1q se disocia a continuación para iniciar una cascada de activación enzimática y disociación de otras proteínas del complemento que se unen a continuación a la superficie de la célula diana y facilitan su muerte a través de, por ejemplo, lisis celular y/o ingestión por un macrófago.

Una revelación clave de la invención es que la CDC provoca el efecto secundario del dolor. Sin querer limitarse por una teoría, las neuronas pueden ser particularmente sensibles a la fijación del complemento debido a que este proceso implica la creación de canales en una membrana celular, permitiendo un flujo iónico descontrolado. En neuronas sensibles al dolor, incluso una pequeña cantidad de fijación del complemento puede ser significativa para generar potenciales de acción. Así, cualquier cantidad de CDC resultante de la unión de anticuerpo anti-GD2 dará como resultado dolor. De acuerdo con la invención, es ventajoso reducir la fijación del complemento a fin de reducir el nivel de efectos secundarios en un paciente.

Sin embargo, si se reduce o elimina la CDC, la actividad antitumoral efectiva del anticuerpo anti-GD2 requiere que se mantengan o incluso se incrementen los niveles de ADCC. Un segundo hallazgo clave de la invención es que la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-GD2 resulta principalmente de la ADCC, y no sustancialmente de la fijación del complemento. Por lo tanto, un aspecto clave de la invención es que es posible reducir o eliminar la función de CDC de un anticuerpo anti-GD2 sin eliminar las capacidades antitumorales del anticuerpo anti-GD2. En otras palabras, un anticuerpo anti-GD2 modificado para reducir o eliminar la fijación del complemento tendrá todavía capacidades antitumorales y por lo tanto puede ser eficaz al tratar el crecimiento de tumores. Por consiguiente, la invención proporciona una mutación en anticuerpos anti-GD2 que reduce la fijación del complemento en una gran extensión mientras que tiene un efecto mínimo sobre la ADCC, tal como la mutación de lisina 322 en alanina (K322A) u otro aminoácido (Thommesen *et al.*, *Mol. Immunol.*, [2000]; 37 (16): 995-1004).

Los anticuerpos anti-GD2 de la invención pueden producirse usando vectores de expresión recombinantes conocidos en la técnica. El término “vector de expresión” se refiere a un constructo de DNA replicable usado para expresar DNA que codifica el anticuerpo anti-GD2 deseado y que incluye una unidad transcripcional de (1) elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores, operadores o potenciadores, enlazados operativamente a (2) una secuencia de DNA que codifica el anticuerpo anti-GD2 deseado que se transcribe en mRNA y se traduce en proteína, (3) secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción. La elección del promotor y otros elementos reguladores varía generalmente de acuerdo con la célula huésped pretendida.

En un ejemplo preferido, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-GD2 modificado se transfecta en una célula huésped usando técnicas de DNA recombinante. En el contexto de la presente invención, el DNA extraño incluye una secuencia que codifica las proteínas de la invención. Células huésped adecuadas incluyen células procarióticas, de levadura o eucarióticas superiores.

Los anticuerpos anti-GD2 recombinantes pueden expresarse en huéspedes de levadura, preferiblemente a partir de especies de *Saccharomyces*, tales como *S. cerevisiae*. También pueden emplearse levaduras de otros géneros tales como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán generalmente un origen de replicación procedente de un plásmido de levadura o una secuencia que se replica autónomamente (ARS, por sus siglas en inglés), un promotor, DNA que codifica el anticuerpo anti-GD2, así como secuencias para poliadenilación, terminación de la transcripción, y un gen de selección. Secuencias promotoras adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-4-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Pueden emplearse diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto para expresar la proteína recombinante de la invención. Sistemas baculovirales para la producción de proteínas en células de insecto son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero adecuadas incluyen células NS/0, células L, líneas celulares C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), HeLa y BHK. Células huésped de

mamífero adecuadas adicionales incluyen células CV-1 (ATCC CCL70) y células COS-7, ambas derivadas de riñón de mono. Otra línea celular de riñón de mono adecuada, CV-1/EBNA, se derivaba mediante transfección de la línea celular CV-1 con un gen que codifica antígeno nuclear de virus de Epstein-Barr 1 (EBNA-1, por sus siglas en inglés) y con un vector que contiene secuencias reguladoras de CMV (McMahan *et al.*, EMBO J., ; 10: 2821-32). El gen de EBNA-1 permite la replicación episomal de vectores de expresión, tales como HAV-EO o pDC406, que contienen el origen de replicación de EBV.

De acuerdo con esta invención, una línea celular particularmente útil para la expresión de anticuerpos anti-GD2 es la línea celular YB2/0 (Shinkawa *et al.*, J. Biol. Chem., [2003]; 278: 3466-3473). Los anticuerpos producidos a partir de esta línea celular tienen ADCC potenciada. Cuando se producen a partir de esta línea celular, los anticuerpos de la invención tienen un oligosacárido enlazado a N diferente al oligosacárido observado en anticuerpos producidos a partir de otras líneas celulares descritas anteriormente. Realizaciones particulares de la invención incluyen anticuerpos anti-GD2 con regiones constantes no mutantes producidos en YB2/0, así como anticuerpos anti-GD2 con regiones constantes que portan mutaciones que reducen la fijación del complemento, tales como Lys322A1a, también producidos en células YB2/0.

Vectores de expresión de mamífero pueden incluir elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor adecuado y un potenciador enlazado al gen que va a expresarse, y otras secuencias no transcritas de flanco 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tales como sitios de unión del ribosoma, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, y secuencias de terminación transcripcional. Promotores y potenciadores comúnmente usados se derivan de poliovirus, adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano. Pueden usarse secuencias de DNA derivadas de genoma viral de SV40, por ejemplo, sitios de origen de SV40, promotor temprano y tardío, potenciador, corte y empalme y poliadenilación para proporcionar los otros elementos genéticos requeridos para la expresión de una secuencia de DNA heteróloga.

Cuando se desea la secreción del anticuerpo modificado desde la célula huésped, el vector de expresión puede incluir DNA que codifica péptidos de señal o líder, preferiblemente situados N-terminalmente con respecto a las cadenas tanto pesada como ligera. En la presente invención, pueden usarse las secuencias de señal naturales de las regiones V del anticuerpo o, alternativamente, puede añadirse una secuencia de señal heteróloga, tal como la secuencia de señal de interleuquina-4.

La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar las proteínas recombinantes de la presente invención que incluye cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende una secuencia de DNA que codifica el anticuerpo anti-GD2 bajo condiciones que promueven la expresión. La proteína deseada se purifica a continuación de medios de cultivo o extractos celulares. Por ejemplo, sobrenadantes de sistemas de expresión que secretan proteína recombinante en el medio de cultivo pueden concentrarse en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada, como se conoce en la técnica.

Un anticuerpo anti-GD2 modificado "aislado" o "purificado" o una porción biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes procedentes de la fuente de células o tejido a partir de la cual se deriva el anticuerpo anti-GD2 modificado, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de anticuerpo anti-GD2 modificado en las que la proteína se separa de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce recombinantemente. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de anticuerpo anti-GD2 modificado que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de no anticuerpo (también denominado en la presente memoria una "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de proteína no perteneciente a anticuerpo, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de proteína no perteneciente a anticuerpo, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de proteína no perteneciente a anticuerpo. Cuando el anticuerpo anti-GD2 modificado o la porción biológicamente activa del mismo se purifica a partir de una fuente recombinante, también está preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10% y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de proteína.

El término "anticuerpo anti-GD2 modificado sustancialmente puro" se refiere a una preparación en la que el anticuerpo anti-GD2 modificado constituye al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% de las proteínas de la preparación.

#### 60 *Métodos de Tratamiento que Usan Proteínas de Anticuerpo Anti-GD2*

Los anticuerpos anti-GD2 modificados de la invención son útiles para tratar cánceres, tales como cánceres que expresan GD2. Tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, neuroblastoma, glioblastoma, melanoma, carcinoma pulmonar microcítico, linfoma de células B, carcinoma renal, retinoblastoma y otros cánceres de origen neuroectodérmico.

*Administración*

Los anticuerpos anti-GD2 modificados de la invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para la administración. Tales composiciones comprenden típicamente los anticuerpos anti-GD2 modificados y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Según se usa en la presente memoria, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” está destinada a incluir todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta de administración pretendida. Ejemplos de rutas de administración incluyen administración parenteral, por ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ej., inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y rectal. Soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenes; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Los medicamentos que contienen los anticuerpos anti-GD2 modificados de la invención pueden tener una concentración de 0,01 a 100% (p/p), aunque la cantidad varía de acuerdo con la forma de dosificación de los medicamentos.

La dosis de administración depende del peso corporal de los pacientes, la gravedad de la enfermedad y la opinión del médico. Sin embargo, generalmente es conveniente administrar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal al día, preferiblemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 2 mg/kg/día en el caso de inyección, y más preferiblemente aproximadamente 0,5 mg/kg/día. La dosis puede administrarse una vez o varias veces al día de acuerdo con la gravedad de la enfermedad y la opinión del médico.

Las composiciones de la invención son útiles cuando se coadministran con uno o más de otros agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos que son un tratamiento estándar en la terapia del cáncer.

**Ejemplos**

## Ejemplo 1

*Expresión de un Anticuerpo Anti-GD2 con una Mutación que Reducía la Fijación del Complemento*

Un plásmido de expresión que expresa las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-GD2 14.18 humano con fijación del complemento reducida debido a mutación se construyó como sigue. El plásmido de expresión para el anticuerpo anti-GD2 14.18 era pdHL7-hu14.18. pdHL7 se derivaba de pdHL2 (Gillies *et al.*, J. Immunol. Methods; 125: 191-202), y usa el potenciador-promotor de citomegalovirus para la transcripción de los genes tanto de la cadena ligera como la pesada de la inmunoglobulina. La mutación K322A en la región CH2 se introdujo solapando reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) usando DNA plasmídico de pdHL7-hu14.18 como plantilla. La secuencia del cebador directo era 5'-TAC AAG TGC GCT GTC TCC AAC (N° ID SEC:6), donde el GCT subrayado codifica la sustitución K322A, y la secuencia del cebador inverso era 5'-T GTT GGA GAC AGC GCA CTT GTA (N° ID SEC:7), donde el AGC subrayado es el anticodón del residuo de alanina introducido. El producto de PCR se clonó y, después de la confirmación de la secuencia, el DNA que contenía la mutación K322A se cortó como un fragmento de restricción Sac II - Nae I de 190 pares de bases (pb) (los sitios de restricción Sac II y Nae I están situados aproximadamente 90 pb aguas arriba y 100 pb aguas abajo, respectivamente, de la mutación K322A), que se usó a continuación para reemplazar el fragmento correspondiente que contenía el K322 silvestre en el pdHL7-hu14.18 para dar pdHL7-hu14.18(K322A). El vector de expresión para el anticuerpo 14.18(K322A), pdHL7-hu14.18 (K322A), se construyó de una manera análoga a la construcción de pdHL7-hu14.18. Sin embargo, un experto en la técnica puede elegir de un número de vectores aceptables para expresar hu14.18 K322A.

## Ejemplo 2

*Transfección y Expresión del Anticuerpo Anti-GD2*

Se usó electroporación para introducir el DNA que codifica el anticuerpo anti-GD2 descrito anteriormente en una línea celular NS/0 de mieloma de ratón o la línea celular YB2/0. Para realizar la electroporación, las células se hicieron crecer en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero bovino fetal inactivado térmicamente al 10%, glutamina 2 mM y penicilina/estreptomina. Aproximadamente  $5 \times 10^6$  células se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS. 10  $\mu$ g de DNA plasmídico linealizado que codifica el anticuerpo anti-GD2 modificado del Ejemplo 1 se incubaron a continuación con las células en una Gene Pulser Cuvette (separación de electrodos 0,4 cm, BioRad) sobre hielo durante 10 min. Se realizó electroporación usando un Gene Pulser (BioRad,

## ES 2 330 860 T3

Hercules, CA) con graduaciones a 0,25 V y 500  $\mu$ F. Se dejó que las células se recuperaran durante 10 min sobre hielo, después de lo cual se resuspendieron en medio de crecimiento y se extendieron sobre dos placas de 96 pocillos.

Se seleccionaron clones establemente transfectados por su crecimiento en presencia de metotrexato (MTX) 100 nM, que se añadía al medio de crecimiento dos días después de la transfección. Las células se alimentaron de dos a tres veces más cada tres días, y clones resistentes a MTX aparecían en de 2 a 3 semanas. Los sobrenadantes procedentes de los clones se ensayaron mediante ELISA anti-Fc para identificar clones que producían grandes cantidades del anticuerpo anti-GD2. Los clones de gran producción se aislaron y se propagaron en medio de crecimiento que contenía MTX 100 nM. Típicamente, se usó un medio de crecimiento libre de suero, tal como medio H-SFM o CD (Life Technologies).

### Ejemplo 3

#### *Análisis Bioquímico del Anticuerpo Anti-GD2*

Se usó caracterización por SDS-PAGE habitual para determinar la integridad de los anticuerpos modificados. Los anticuerpos anti-GD2 modificados se capturaron sobre cuentas de Protein A Sepharose (Repligen, Needham, MA) desde el medio de cultivo tisular en el que se secretaban, y se eluyeron hirviendo en tampón de muestra de proteína, con o sin un agente reductor tal como  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE y las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción de Coomassie. Los resultados de SDS-PAGE mostraban que las proteínas de anticuerpo anti-GD2 modificado analizadas estaban presentes sustancialmente como una sola banda, indicando que no existía ninguna cantidad significativa de degradación.

### Ejemplo 4

#### *Citotoxicidad Mediada por Células Dependiente de Anticuerpos (ADCC) y Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC) de Anticuerpos de la Invención*

Para demostrar que los anticuerpos modificados de la invención tenían las propiedades deseadas, la capacidad de los anticuerpos para mediar en la ADCC se examinó usando procedimientos estándar, esencialmente como se describe por Idusogie *et al.* (J. Immunol., [2000]; 164: 4178-4184). Los anticuerpos se probaron contra dos líneas celulares positivas a GD2, negativas a EpC AM (M-21 y LN-229) y, como un control, una línea celular negativa a GD2, positiva a EpCAM (A431) usando PBMCs humanas como células efectoras en un ensayo de liberación de cromo estándar. Todos los anticuerpos tenían un isotipo de IgG1 humana.

Versiones humanas de IgG2 de anticuerpo anti-GD2 14.18 expresado en células NS/0; 14.18 con la mutación K322A, expresado en células NS/0; 14.18 con la mutación K322A, expresado en células YB2/0; y 14.18 configurado con un Fv monocatenario fusionado a un Fc, expresado en células NS/0; se ensayaron para determinar su actividad de ADCC midiendo el porcentaje de células M-21 diana sometidas a lisis de acuerdo con métodos estándar descritos previamente. El anticuerpo KS- 1/4, que no se une a células diana, también se ensayó para servir como control. Según se muestra en la Figura 6, la variante K322A desarrollada en células YB2/0 tenía los niveles globales más altos de ADCC en comparación con todos los otros constructos de anticuerpo probados.

Los mismos constructos se probaron además en un ensayo similar usando células que expresan GD2 LN-229 como las células diana. El anticuerpo KS-1/4 se usó como control. Según se muestra en la Figura 7, la variante K322A desarrollada en células YB2/0 tenía los niveles globales más altos de ADCC en comparación con todos los otros constructos de anticuerpo probados.

- Como control, la actividad de ADCC de los mismos anticuerpos anti-GD2 se probó contra células A431 que no expresan el glicolípido GD2. Como podría esperarse, los anticuerpos anti-GD2 mostraban poca, si es que alguna, actividad, mientras que el anticuerpo KS-1/4 que se sabe que tiene actividad de ADCC contra células que expresan EpCAM demostraba una actividad creciente a medida que se incrementaban las concentraciones del anticuerpo. (Véase la Figura 8). Esto indica que los niveles de lisis alcanzados en el ensayo de anticuerpo anti-GD2 con células M-21 en el ensayo previo no necesitaban ajustarse para ningún nivel de fondo de actividad de lisis.

Para probar la capacidad de anticuerpos anti-GD2 para mediar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés), se ensayaron versiones humanas de IgG1 de 14.18 expresadas en células NS/0; dos muestras de 14.18 con la mutación K322A, expresado en células NS/0; 14.18 con la mutación K322A, expresado en células YB2/0; y 14.18 configurado como un Fv monocatenario fusionado a un Fc, expresado en células NS/0. Anticuerpos anti-GD2 de la invención se examinaron en ensayos de lisis de células M-21 y LN-229 de acuerdo con procedimientos estándar, esencialmente según se describe por Idusogie *et al.* (J. Immunol., [2000]; 164: 4178-4184). Se usó una dilución 1:10 de complemento humano. El anticuerpo KS-1/4, que no se une a las células diana, se usó de nuevo como control.

Se encontró que la fijación del complemento mediada por los anticuerpos de la invención se reducía profundamente. Según se muestra en la Figura 9, sólo 14.18 desarrollado en células NS/0 tenía niveles de fijación del complemento a bajas concentraciones, mientras que los anticuerpos que contenían la mutación K322A exhibían poca o ninguna actividad de CDC a bajas concentraciones. Según se muestra en la Figura 10, sólo los anticuerpos anti-GD2 14.18

## ES 2 330 860 T3

desarrollados en células NS/0 demostraban actividad de fijación del complemento contra células LN229, según se medía mediante el porcentaje de células diana sometidas a lisis. Las variantes K322A demostraban todas poca o ninguna actividad de CDC a cualquier concentración.

5 Tomados juntos, los resultados de los ensayos de ADCC y CDC indican que ciertos anticuerpos anti-GD2 modificados de la invención median en la ADCC, pero tienen niveles significativamente reducidos de fijación del complemento, especialmente en comparación con anticuerpos anti-GD2 típicos que se han usado en experimentos clínicos humanos.

### Ejemplo 5

10

#### *Tratamiento de Ratones que Tienen Tumores que Expresan GD2 con Anticuerpos Anti-GD2 Modificados*

15 Para demostrar la eficacia de los anticuerpos anti-GD2 modificados de la invención; el anticuerpo modificado del Ejemplo 1 se prueba en un modelo en ratones de melanoma o neuroblastoma. Se usan ratones beis Hu/SCID. Las mutaciones SCID y beis suprimen el sistema inmunitario del ratón normal, de modo que pueden añadirse células inmunitarias humanas para reconstituir el sistema inmunitario. Se usan mononucleocitos de sangre periférica humana (PBMCs, por sus siglas en inglés). Es necesario usar células inmunitarias humanas debido a que la región Fc de IgG1 humana no es reconocida por receptores de Fc múridos para alcanzar ADCC.

20 A continuación, células que expresan GD2 se implantan en los ratones. Por ejemplo, las células se implantan subcutáneamente, y su crecimiento se verifica dos veces por semana con calibres para estimar el volumen del tumor. Como un modelo de neuroblastoma, se usa la línea celular NXS2 que expresa GD2 (Greene *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, [1975]; 72: 4923-27). Como un modelo de melanoma, se usa la línea celular B16, modificada para expresar GD2 (Haraguchi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, [1994]; 91: 10455-59).

25

30 Se dejan crecer tumores subcutáneos hasta un tamaño de aproximadamente 25 a 200 milímetros cúbicos y se inicia el tratamiento. Debido a que la semivida en suero de los anticuerpos modificados de la invención es de varios días, los animales se tratan solo de una a tres veces por semana. Se encuentra que los volúmenes de los tumores en los ratones tratados bien con vehículo o bien con un anticuerpo de control se incrementan rápidamente, mientras que los volúmenes de los ratones tratados con los anticuerpos modificados de la invención se incrementan más lentamente, o se estabilizan, o en algunos casos caen.

### Ejemplo 6

#### *Determinación de la Dosis Tolerada Máxima en un Experimento Clínico en Fase I*

35 Para determinar la dosis tolerada máxima de un anticuerpo anti-GD2 modificado de la invención, se realiza un experimento clínico en Fase I esencialmente como se describe Yu *et al.* (J. Clin. Oncol., [1998]; 16: 2169-80). Se encontró que la dosis tolerada máxima del anticuerpo 14.18 quimérico basado en IgG1 humana presentado por Yu *et al.* era aproximadamente 20 mg/m<sup>2</sup>. Se encuentra que la dosis tolerada máxima del anticuerpo anti-GD2 modificado de la invención es superior a 20 mg/m<sup>2</sup>.

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido de inmunoglobulina que comprende una región variable de un anticuerpo anti-GD2, un dominio CL y una región Fc de una inmunoglobulina IgG1, que comprende un dominio CH1 y posee una mutación K322A para disminuir o eliminar la fijación del complemento (CDC), en donde la cadena pesada del polipéptido de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos que se representa en el N° ID SEC. 5 y la cadena ligera del polipéptido de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos del N° ID SEC. 2.
- 10 2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se mantiene la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).
3. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que provoca una actividad de ADCC potenciada, obtenible produciendo dicho polipéptido en células YB2/0.
- 15 4. Una molécula de DNA que codifica para un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Una célula de expresión que comprende la molécula de DNA de acuerdo con la reivindicación 4.
- 20 6. La célula de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la célula es una célula YB2/0.
7. Una composición farmacéutica que comprende en una cantidad eficaz un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente eficaz.
- 25 8. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para la fabricación de un medicamento para reducir el dolor en la terapia del cáncer.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en neuroblastoma, glioblastoma, osteosarcoma, melanoma, carcinoma pulmonar microcítico, linfoma de células B, carcinoma renal y retinoblastoma.
- 30 10. Uso de un polipéptido de inmunoglobulina que comprende una región variable de un anticuerpo anti-GD2, un dominio CL y una región Fc de una inmunoglobulina IgG1, que comprende un dominio CH1 y posee una mutación K322A para disminuir o eliminar la fijación del complemento (CDC) mientras que mantiene la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), para la fabricación de un medicamento para reducir el dolor en la terapia del cáncer.
- 35

40

45

50

55

60

65

Cadena Pesada Madura de IgG1 de Hu14.18

EVQLVQSGAEVEKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWRQNI~~G~~KSLEWIGAI~~D~~PYYGGTSYNQKF  
KGRATLTVDKSTSTAYMHLKSLRSEDTAVYYCVSGMEYWGQ~~G~~TSVTVSSASTKGPSVFPLAPSS  
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~G~~VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKRV~~E~~PKSCDKHTCPCPAP~~E~~LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVS  
NKALPAPIEKTI~~S~~KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 1)

FIG. 1

Cadena Pesada Madura de IgG1 de Hu14.18 con Mutación K322A

EVQLVQSGAEVEKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWRQNI~~G~~KSLEWIGAI~~D~~PYYGGTSYNQKF  
KGRATLTVDKSTSTAYMHLKSLRSEDTAVYYCVSGMEYWGQ~~G~~TSVTVSSASTKGPSVFPLAPSS  
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~G~~VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ  
TYICNVNHKPSNTKVDKRV~~E~~PKSCDKHTCPCPAP~~E~~LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVS  
NAALPAPIEKTI~~S~~KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV~~F~~SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO: 5)

FIG. 2

Cadena Ligera Madura de IgG1 de Hu14.18

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFGV  
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD  
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY  
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

FIG. 3

Secuencia de codificación de la Cadena Pesada Madura de IgG1 de Hu14.18, con

Intrones

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGGAGAAGCCCGGCGCCTCCGTGAAGATCTCCT  
 GCAAGGCCTCCGGCTCCTCCTTACCAGGCTACAACATGAACTGGGTGCGCCAGAACATCGGCAA  
 GTCCCTGGAGTGGATCGGCGCCATCGACCCCTACTACGGCGGCACCTCCTACAACCAGAAGTTC  
 AAGGGCCGCGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCCACCTCCACCGCCTACATGCACCTGAAGTCCC  
 TCGCTCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGTGTCCGGCATGGAGTACTGGGGCCAGGGCAC  
 CTCGTGACCGTGTCTCCGGTAAGCTTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGG  
 CAGGGAGGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCC  
 AGACACTGGACGCTGAACCTCGCGGACAGTTAAGAACCAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCAG  
 CTCTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACACCTCTCTTGAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG  
 TCTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT  
 CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGGCCCTGACCAGCGGGCTG  
 CACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGC  
 CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA  
 GGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCT  
 CAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCC  
 GTCTGCCTCTTACCCGGAGGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGC  
 TTTTCTCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCAGGCCCTGCACACAAAGG  
 GCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCCTGCCCTGACCTAAGC  
 CCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCAGATTCCAG  
 TAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG  
 CCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAGGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCC  
 TGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGTGTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCCTCAGCACCT  
 GAACTCTGGGGGGACCGTCACTCTTCTTCTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGATCT  
 CCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT  
 CAACTGGTACGTGGACCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC  
 AACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG  
 AGTACAAGTGGCTGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGC  
 CAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCCTCTGC  
 CCTGAGAGTGACCGTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC  
 ACCCTGCCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
 GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAA  
 GACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAC  
 AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC  
 ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 3)

FIG. 4

Secuencia de Codificación de la Cadena Ligera Madura de IgG1 de Hu14.18, con

Intrones

GACGTGGTGATGACCCAGACCCCCCTGTCCCTGCCCGTGACCCCCGGCGAGCCCCGCTCCATCT  
CCTGCAGATCTAGTCAGAGTCTTGTACACCGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCA  
GAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATTCACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCA  
GACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG  
AGGATCTGGGAGTTTATTTCTGTTCTCAAAGTACACATGTTCCCTCCGCTCACGTTCCGGTGTGG  
GACCAAGCTGGAGCTGAAACGTATTAGTGTGTGTCAGGGTTTACAAGAGGGACTAAAGACATGTC  
AGCTATGTGTGACTAATGGTAATGTCACTAAGCTGCGGGATCCCGCAATTCTAAACTCTGAGGG  
GGTCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAAAGCATTGAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATG  
CAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTCCAACAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAG  
GGGAAGCTAGGAAGAACTCAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTAT  
AATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAA  
CAACACACCCAGGGCAGAAGTTTGTACTTAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCTCAGGAA  
CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGC  
CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGAT  
AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT  
ACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTG  
CGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT  
(SEQ ID NO: 4)

FIG. 5

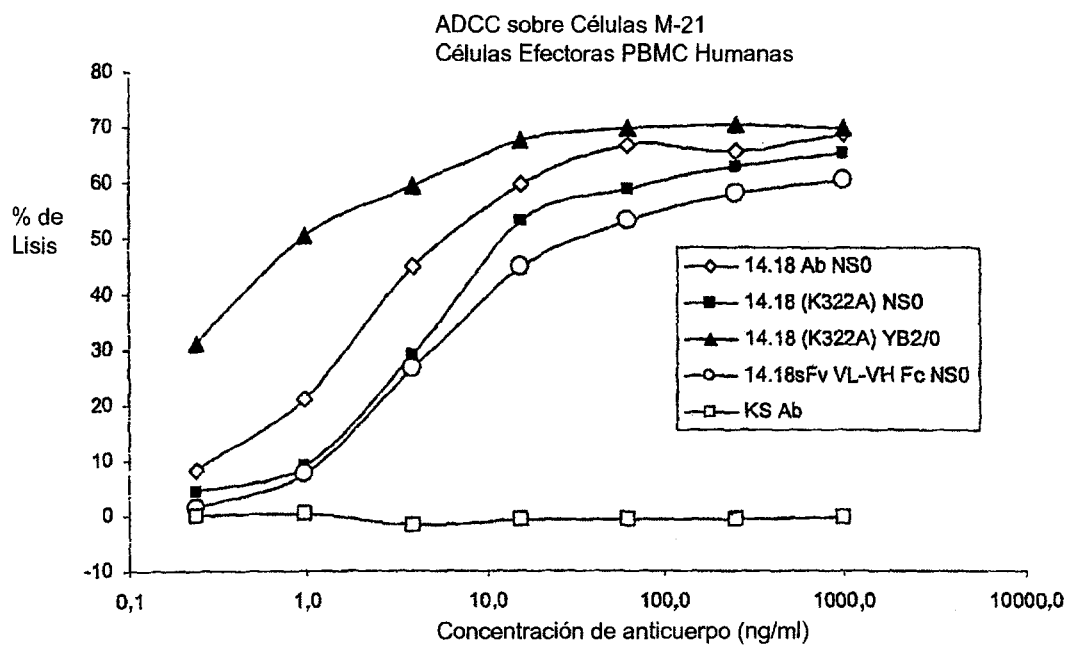


FIG. 6

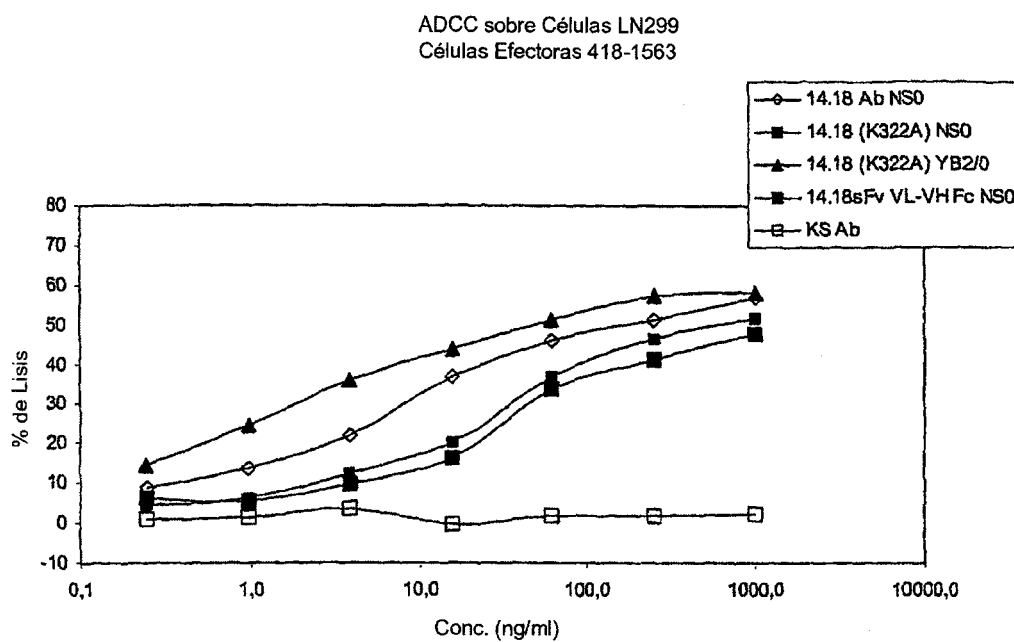


FIG. 7

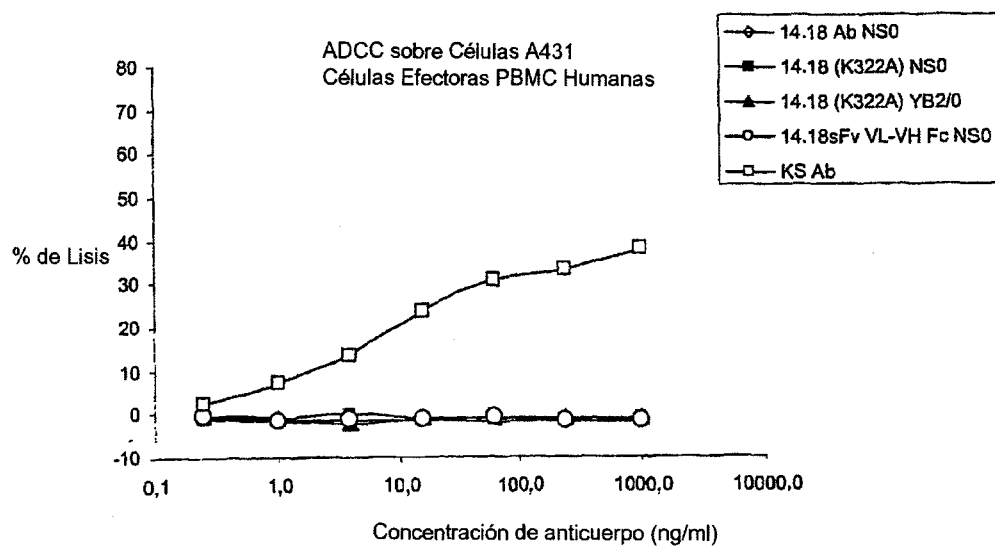


FIG. 8

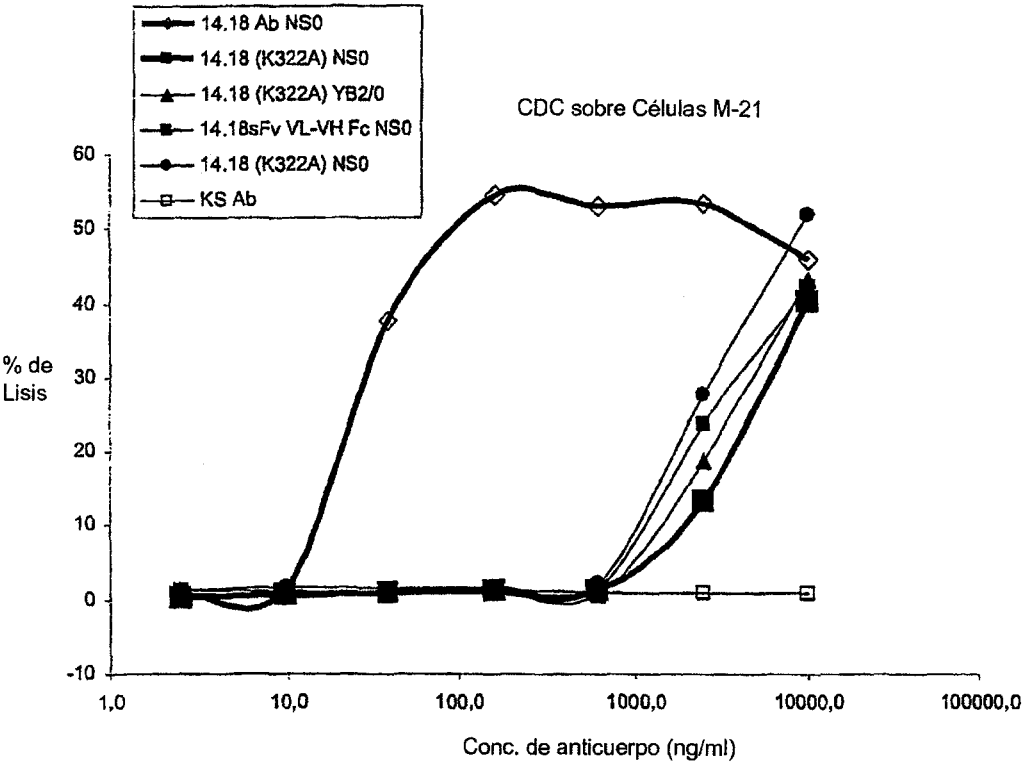


FIG. 9

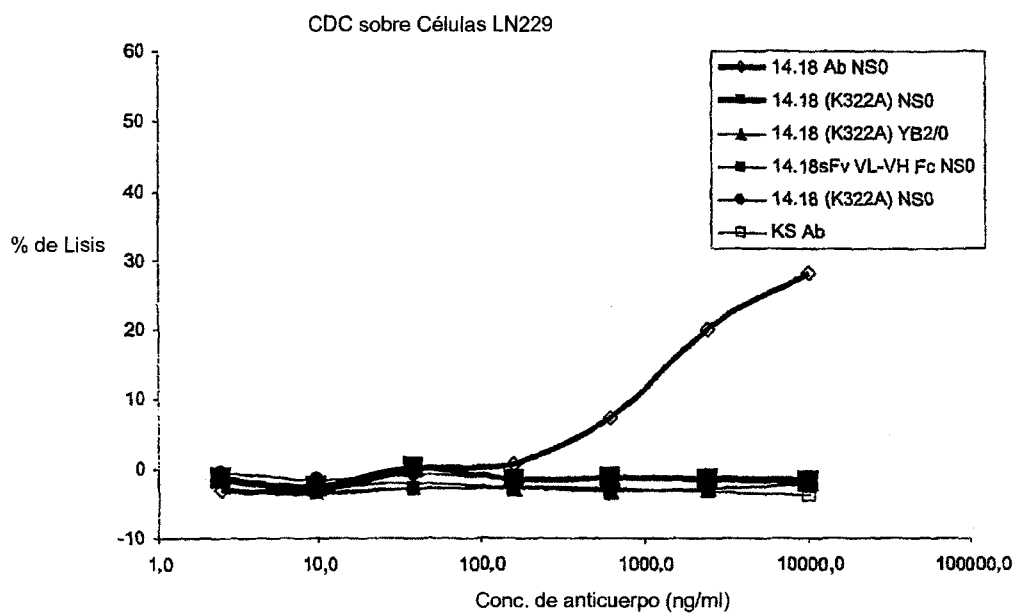


FIG. 10

Secuencia de Aminoácidos de la Proteína de Fusión Madura sFv(VL-VH)-Fc de  
14.18 Humano

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIHKVSNRFGVVP  
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPLTFGAGTKLELKS GGGGSGGGGSGGGG  
SGGGGSEVQLVQSGAEVEKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNVWRQNI GKSLEWIG AIDPYYGGT  
SYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMHLKSLRSED TAVYYCVSGMEYWGQGT SVTVSSEPKSCDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP E VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P  
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:9)

FIG. 11

Secuencia de DNA que Codifica la Proteína de Fusión Madura sFv(VL-VH)-Fc de  
14.18 Humano, con Intrones:

GACGTGGTGATGACCCAGACCCCCCTGTCCCTGCCCGTGACCCCCGGCGAGCCCGCCTCCATCT  
 CCTGCAGATCTAGTCAGAGTCTTGTAACACCGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCA  
 GAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATTACAAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCA  
 GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTG  
 AGGATCTGGGAGTTTATTTCTGTTCTCAAAGTACACATGTTCCCTCCGCTCACGTTCCGGTGGG  
 GACCAAGCTGGAGCTGAAATCCGGAGGCGGTGGGTCCGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGTGGAGGC  
 AGCGTGGTGGGGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGGAGAAGCCCGGCG  
 CCTCCGTGAAGATCTCCTGCAAGGCCTCCGGCTCCTCCTTACCAGGCTACAACATGAACTGGGT  
 GCGCCAGAACATCGGCAAGTCCCTGGAGTGGATCGGCGCCATCGACCCCTACTACGGCGGCACC  
 TCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCCGCGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCCACCTCCACCGCT  
 ACATGCACCTGAAGTCCCTGCGCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGTCCGGCATGGA  
 GTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACCGTGTCCCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC  
 ACATGCCACCCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGT  
 GCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCT  
 CTTCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA  
 CACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC  
 CTTGAGGTCAAGTTCAACTGTTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC  
 GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCCAGCGTCCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTG  
 GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA  
 ACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTC  
 GGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAG  
 AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC  
 CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG  
 GAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCA  
 AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA  
 GGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA (SEQ ID  
 NO: 8)

FIG. 12