# ANTICUERPOS RECOMBINANTES CON ESPECIFICIDAD DUAL POR GANGLIÓSIDOS Y SU USO

## SECTOR TÉCNICO

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

## ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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

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

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

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

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

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

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

*Anticuerpos monoclonales que reconocen al N-acetil GM3*

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

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

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

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

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

De los diferentes anticuerpos anti-GM3 descritos en la literatura, se han publicado evidencias de actividad anti-tumoral *in vitro* e *in vivo* para los mAbs DH2 y L612. El anticuerpo DH2 indujo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos *in vitro* e inhibió el crecimiento de células de melanoma B16 en ratones C57BL/6 (Dohi y cols., Cancer Res 48, 5680-5, 1988). El mAb L612 produjo citotoxicidad dependiente de complemento en experimentos realizados *in vitro* con células de cáncer que expresan el GM3 (Nishinaka y cols., J Immunogenetics 48:73-5, 1998). Una versión ingenierizada de este anticuerpo, en formato de IgM hexamérica, mostró una capacidad incrementada de producir muerte celular dependiente de complemento, y un mayor efecto anti-tumoral en ratones (Azuma y cols., Clin Cancer Res 13:2745-50, 2007).

El mAb L612 ha sido usado en la clínica, en un ensayo fase I que involucró a nueve pacientes con melanoma metastásico (Irie y cols., Cancer Immunol Immunother 53:110-7, 2004). Hasta el presente, este es el único ensayo clínico con un anticuerpo anti N-acetil GM3 que ha sido documentado. Varios pacientes tuvieron respuestas clínicas al tratamiento. El anticuerpo, además, no produjo efectos tóxicos a pesar de la ubicuidad del N-acetil GM3 en los tejidos normales.

El N-acetil GM3 ha sido también diana de terapia activa en la clínica, en un ensayo fase 1 con la vacuna GM3/VSSP, en pacientes con melanoma (Guthmann y cols., J Immunother 27:242-51, 2004). Previamente, en un ensayo preclínico realizado en monos durante 12 meses, la vacuna generó una fuerte respuesta de anticuerpos anti-GM3 de tipo IgM e IgG, y sin embargo, no produjo efectos tóxicos (Bada y cols., Exp Toxicol. 21:263-7, 2002). En el ensayo clínico, los anticuerpos anti-N-acetil-GM3 generados en los pacientes fueron de tipo IgM, y tampoco se observaron efectos tóxicos de consideración.

*Anticuerpos monoclonales que reconocen al N-glicolil GM3*

Dos anticuerpos monoclonales que reconocen al N-glicolil GM3, pero no a su variante N-acetilada, han sido descritos en la literatura: el mAb P3 (IgM murina) (Vazquez y cols., Hybridoma 14:551-56, 1995) y el mAb 14F7 (IgG murina) (Carr y cols., Hybridoma 19:241-47, 2000). El anticuerpo P3 reconoce también a otros gangliósidos N-glicolilados (Moreno y cols., Glycobiology 8, 695-708, 1998), mientras que el anticuerpo 14F7 ha demostrado ser específico por el N-glicolil GM3.

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

*El anticuerpo monoclonal 14F7*

El anticuerpo monoclonal murino 14F7, producido por el hibridoma depositado con el número de acceso ECACC 98101901, está descrito en la solicitud de patente EP

0972782/A1. Variantes humanizadas y fragmentos de este anticuerpo se describen en la solicitud de patente WO 2004/094477/A1.

El mAb 14F7 es una inmunoglobulina de isotipo IgG1 que reconoce al N-glicolil GM3 con alta especificidad (Carr y cols., Hybridoma 19:241-47, 2000) y alta afinidad, con una constante de disociación del orden de $10^{-8}$ M, medida para su fragmento scFv (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que el anticuerpo 14F7 reconoce varios tipos de tumores, como carcinoma ductal de mama y melanoma (Carr y cols., Hybridoma 19:241-47, 2000), adenocarcinomas de estómago, cólon y páncreas (Blanco y cols., ISRN Gastroenterol, Article ID 645641, 2011), tumores del sistema genitourinario (Blanco y cols., ISRN Pathology, Article ID 953803, 2011) y tumores neuroectodérmicos (Scursoni y cols., Clin Devel Immunol, Article ID 245181, 2011).

El sitio de unión del mAb 14F7 al N-glicolil GM3 está ubicado en la región variable de su cadena pesada (VH), como fue demostrado a partir de la construcción de una biblioteca de fragmentos scFv expresados sobre bacteriófagos, que combinan el dominio VH del mAb 14F7 con una gran variedad de dominios variables de cadenas ligeras (VL), tanto murinas como humanas (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004). Más de un tercio de los fragmentos de esta biblioteca fueron capaces de reconocer al N-glicolil GM3, lo cual demuestra además, que el dominio VH del mAb 14F7 puede asociarse a dominios VL diferentes y mantener la especificidad original del anticuerpo.

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

Estudios posteriores demostraron que el anticuerpo 14F7 mata las células tumorales, pero no células normales, mediante un novedoso mecanismo que provoca daños en la membrana celular (Roque-Navarro y cols., Mol Cancer Ther 7:2033-41, 2008). La alta afinidad del mAb 14F7 es un factor importante para producir este tipo de muerte, como demuestran experimentos recientes con un mutante del anticuerpo P3 con afinidad incrementada (Fernandez-Marrero y cols. Mol Immunol 48:1059-67, 2011). El anticuerpo P3, o su variante quimérica P3Q (que tiene la región variable del mAb P3 y región constante de IgG1 humana), no es capaz de producir muerte celular independiente de complemento en células tumorales que expresan el N-glicolil GM3. Sin embargo, el mutante P3Q E99R obtenido por Fernandez-Marrero y colaboradores, que tiene una mayor afinidad por el N-glicolil GM3 (intermedia entre la afinidad de los mAbs P3Q y 14F7), sí es capaz de producir muerte celular independiente de complemento. El mAb 14F7, con mayor afinidad, tiene un efecto de muerte mayor que el producido por el mutante P3Q E99R.

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

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

*Bibliotecas de fragmentos de anticuerpos expresados sobre bacteriófagos*

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

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

*Anticuerpos de especificidad dual*

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

Con las técnicas de la ingeniería genética ha sido posible crear diversas soluciones para obtener anticuerpos, o fragmentos derivados de estos, con la capacidad de reconocer dos o más moléculas. Estos enfoques han consistido fundamentalmente en la combinación de más de un sitio de unión de anticuerpo, cada uno con una especificidad diferente, en una misma construcción molecular (Hudson y Souriau, Nat Med 9:129-34, 2003; Hollander, Immunotherapy 1:211-22, 2009).

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

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

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

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

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

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

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

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

QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYRFRSYQIHWLKQRPDQGLEWIGYIDP
ATAYTESNQKFKDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESPRLRRGIY
YYAMDYWGQGTSVTVSS

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

QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYRFRSYQIHWLKQRPDQGLEWIGYIDP
ATAYTESNQKFKDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESPRLRRGIY
YYAMDYWGQGTSVTVSS

y

sec. con núm. de ident: 2:

DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSCRASQSISNNLHWYQQRTHESPRLLIKYASQSIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFCQQSNRWPLTFGAGTKLELKRA

En otro aspecto la invención se refiere al anticuerpo monoclonal con región variable de pesada con sec. con núm. de ident: 1:
QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYRFRSYQIHWLKQRPDQGLEWIGYIDP
ATAYTESNQKFKDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESPRLRRGIY
YYAMDYWGQGTSVTVSS y la secuencia de la región variable de la cadena ligera es cualquier secuencia de región variable de cadena ligera de un anticuerpo.

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

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

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

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

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

CDR-H2 YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17
CDR-H2 YINPATASTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 18
CDR-H2 FIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 19
CDR-H2 DIDPGRAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 20
CDR-H2 YIDPATANTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 21
CDR-H2 FINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 22
CDR-H2 FIDPASAYTVSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 23
CDR-H2 YIDPATAKTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 24
CDR-H2 YINPGSAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 25
CDR-H2 YLDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 26
CDR-H2 YVDPANAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 27

CDR-H2 YINPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 28
CDR-H2 YIDPATAWTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 29
CDR-H2 YIDPGTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 30
CDR-H2 YIDPRTAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 31
CDR-H2 YVDPATAHTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 32
CDR-H2 YINPATAYTDSNQKFKD, sec. con núm. de ident: 33

En aun otra modalidad, el anticuerpo de la presente invención se caracteriza porque la secuencia de la CDR-H3 se selecciona del grupo que consiste de:

CDR-H3 ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
CDR-H3 ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
CDR-H3 ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
CDR-H3 ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
CDR-H3 ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

En otra modalidad el anticuerpo de la invención comprende cualquier combinación de secuencias de las CDRs H1, H2 y H3 de las reivindicaciones enumeradas anteriormente.

En otra modalidad el anticuerpo de la invención se caracteriza porque la secuencia del CDR-H2 y/o la secuencia del CDR-H3 contienen al menos una de las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste de:

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

Y adicionalmente comprende cualquier cadena ligera de anticuerpo

En otra modalidad particular la invención comprende las regiones constantes IgG1 humana para cadena pesada y CK para la cadena ligera.

En otro aspecto la presente invención se refiere a los fragmentos Fab, Fab', (Fab)2 y scFv de los anticuerpos de la presente descripción.

Los fragmentos de la presente invención se caracterizan por:

una secuencia de la CDR-H1 que se selecciona del grupo que consiste de:

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

CDR-H1 GYTFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 13
CDR-H1 GYPFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 14
CDR-H1 GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
CDR-H1 GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16

una secuencia de la CDR-H2 que se selecciona del grupo que consiste de:

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

una secuencia de la CDR-H3 que se selecciona del grupo que consiste de:

CDR-H3 ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
CDR-H3 ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
CDR-H3 ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
CDR-H3 ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
CDR-H3 ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

En otra modalidad el fragmento de la invención comprende cualquier combinación de secuencias de las CDRs H1, H2 y H3 enumeradas anteriormente.

Estos anticuerpos y sus fragmentos son útiles para los fines diagnósticos y terapéuticos que se exponen en la presente descripción. Por lo que en otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones que comprenden los anticuerpos de la presente descripción y/o fragmentos de éstos para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades relacionadas con los antígenos gangliósidos N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3.

Preferentemente, la presente invención engloba composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o varios anticuerpos, o fragmentos derivados de estos anticuerpos, con especificidad dual y alta afinidad por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3. Con mayor preferencia, la invención comprende composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo y/o

fragmento de la presente invención y un vehículo y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Con aun mayor preferencia la presente invención comprende un anticuerpo con la región variable de la cadena pesada de sec. con núm. de ident: 1 y la región variable de la cadena ligera de sec. con núm. de ident: 2.

En un aspecto la presente invención también se refiere a métodos de tratamiento que comprenden los anticuerpos de la invención y fragmentos de éstos a sujetos portadores de tumores que expresan al menos uno de los antígenos gangliósido N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3. En una modalidad particular el sujeto es un humano.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un juego de reactivos útil en el diagnóstico de tumores, que comprende al menos uno de los anticuerpos de la invención y/o fragmentos derivados de éstos. En una modalidad particular el método comprende pero no se limita al diagnóstico, por ejemplo, en base a la presencia del antígeno asociado a la patología, por ejemplo el gangliósido N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3 en una muestra de tejido o fluido del paciente, por ejemplo, una muestra de tejido tumoral, muestra de sangre, etc.

*Método de obtención de los anticuerpos de la invención*

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

Los anticuerpos que son objeto de esta invención se obtuvieron a partir de una biblioteca de genes de fragmentos de regiones Fv de cadena simple (scFv), diseñada especialmente con ese propósito. La racionalidad y originalidad del diseño estuvieron dadas en primer lugar por la selección cuidadosa de las posiciones a aleatorizar en la secuencia de aminoácidos de los fragmentos de anticuerpo, restringiendo las mutaciones a la zona más probable de interacción con el antígeno.

En la presente descripción se usa el esquema de numeración de Kabat para numerar la secuencia de la región VH del anticuerpo. Para los anticuerpos y sus fragmentos que son objeto de la presente invención, este esquema de numeración introduce letras de inserción en la región VH, después de las posiciones 52 (52A), 82 (82A a 82C) y 100 (100A a 100H).

Como cadena ligera (dominio VL) de los fragmentos scFv de la biblioteca, se escogió la cadena ligera del fragmento 3Fm, que se obtuvo en un trabajo anterior (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004). Este fragmento contiene el dominio VH del mAb 14F7, mientras que su dominio VL se extrajo de una biblioteca de cadenas ligeras murinas y no está relacionado con el dominio VL original del mAb 14F7. Sin embargo, a pesar de tener una cadena ligera diferente, el fragmento 3Fm mantuvo la especificidad y alta afinidad por el NeuGc-GM3 del mAb 14F7 y además se pudo expresar en bacteria. Tomando en cuenta los datos experimentales obtenidos por Rojas y colaboradores (J Immunol Methods 293:71-83, 2004) y por Krengel y colaboradores (J Biol Chem 279:5597-603, 2004), los cuales indican que la cadena ligera no es

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Selección de fragmentos scFv con especificidad dual*

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

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

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

*Caracterización del sitio de unión de los anticuerpos con especificidad dual*

Además de los fragmentos con especificidad dual por NeuAc-GM3 y NeuGc-GM3, también fueron secuenciados otros fragmentos de anticuerpo derivados de la biblioteca que solo reconocen al N-glicolil GM3, así como fragmentos que no fueron capaces de reconocer a ninguno de los dos gangliósidos en experimentos de ELISA. Adicionalmente, y partiendo de uno de los fragmentos con especificidad dual seleccionados de la biblioteca, se estudió la influencia de un grupo particular de posiciones de la región VH, realizando una aleatorización exhaustiva de manera individual para cada posición.

Estos estudios permitieron determinar en detalle cuáles de los aminoácidos del sitio de unión del anticuerpo son los más importantes para el reconocimiento dual del N-glicolil GM3 y del N-acetil GM3. En la Tabla 1 se muestra un grupo de secuencias de los CDRs de la cadena pesada de fragmentos scFv con especificidad dual, extraídos de la biblioteca. En la Tabla 2 se muestran las posiciones en la secuencia del dominio VH que son relevantes para la especificidad dual, y las posiciones que admiten diferentes grados de variabilidad en aminoácidos.

Solo dos o tres mutaciones en el CDR H1 fueron suficientes para conferir a los fragmentos de anticuerpo la capacidad de unirse también al N-acetil GM3, además de al N-glicolil GM3. En particular, las sustituciones Ser 28 → Arg, Thr 30 → Arg y Trp 33 → Gln produjeron un mutante (mutante RRQ) con alta afinidad por ambos gangliósidos.

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

La presente invención comprende inmunoglobulinas de cualquier isotipo, ya sea de origen humano, murino o de otra especie, así como cualquier tipo de fragmento de estas inmunoglobulinas, que tengan especificidad dual por los gangliósidos NeuAc-GM3 y NeuGc-GM3. Una inmunoglobulina de cualquier isotipo deseado se puede construir a partir de la secuencia de aminoácidos de la región VH de un fragmento scFv con la capacidad de unirse a ambos gangliósidos, y de una secuencia de región VL de procedencia murina, humana, o de otra especie. Este propósito se puede lograr empleando técnicas establecidas de la biología molecular, utilizando cualquiera de los vectores descritos para la expresión eficiente de proteínas recombinantes, particularmente de anticuerpos monoclonales.

En una forma de realización, se puede construir una inmunoglobulina de isotipo IgG1 utilizando los vectores pAH4604 y pAG4622 (Coloma y cols., J Immunol Methods 52:89-104, 1992), comúnmente usados para la expresión de inmunoglobulinas en células superiores.

La secuencia VH a utilizar para construir una inmunoglobulina con especificidad dual por los gangliósidos NeuAc-GM3 y NeuGc-GM3, puede ser extraída directamente de la

biblioteca de fagos construida en la presente invención, o puede ser diseñada a partir de los datos experimentales mostrados en la Tabla 1, conservando en la secuencia las posiciones importantes para la especificidad dual e introduciendo cualquiera de los aminoácidos apropiados en las posiciones de los CDRs que permiten algún grado de variabilidad. La secuencia VL a utilizar admite un alto grado de variabilidad, tanto en las regiones marco como en los lazos hipervariables, como fue demostrado en (Rojas y cols., J Immunol Methods 293:71-83, 2004).

En otra forma de realización, la presente invención incluye también inmunoglobulinas quiméricas, o sea, con regiones constantes humanas y regiones variables humanas, así como inmunoglobulinas con regiones variables humanizadas.

*Composiciones farmacéuticas*

En una forma de realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la presente invención, o fragmentos de éstos. En una forma de realización, estas composiciones farmacéuticas comprenden también un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable o adyuvante" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. El término "vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable " se refiere a un vehículo o adyuvante que se puede administrar a un sujeto, junto con los anticuerpos o fragmentos, y que no destruye la actividad farmacológica de éstos y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para entregar una cantidad terapéutica de los anticuerpos. Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de rutas de administración incluyen entre otras parenteral, por ejemplo, parenteral, intradérmica intravenosa y subcutánea. Las soluciones o suspensiones que se usan para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina. aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

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

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

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

*Métodos de tratamiento*

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

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

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

## BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

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

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

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

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

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

**EJEMPLOS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La capacidad del anticuerpo 7C1 de matar células tumorales que expresan N-acetil GM3 o N-glicolil GM3, por un mecanismo de muerte celular independiente de complemento, fue demostrada en experimentos realizados con las líneas celulares L1210 y L1210-SH.

Para inducir la muerte con el anticuerpo, las células fueron suspendidas en medio de cultivo con 1% de suero fetal bovino a una concentración de 1 millón de células por mililitro, y luego incubadas con el anticuerpo en una atmósfera de 5% de CO2 a 37 grados centígrados durante 3 horas. Posteriormente las células fueron lavadas, suspendidas en PBS con yoduro de propidio (PI) a 10 microgramos/mililitro, y analizadas por citometría de flujo. Las células muertas fueron identificadas a partir de la medición de la dispersión frontal y lateral, y de la incorporación de PI. Las células con

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal anti-gangliósidos caracterizado porque tiene especificidad dual y alta afinidad por los gangliósidos N-acetil GM3 y N-glicolil GM3.

2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1, caracterizado porque la región variable de la cadena pesada contiene los siguientes CDRs:

CDR-H1: GYRFRSYQIH, sec. con núm. de ident: 3
CDR-H2: YIDPATAYTESNQKFKD, sec. con núm. de ident: 17
CDR-H3: ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 caracterizado porque la secuencia de la región variable de la cadena pesada es la sec. con núm. de ident: 1, QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYRFRSYQIHWLKQRPDQGLEWIGYIDP ATAYTESNQKFKDKAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARESPRLRRGIY YYAMDYWGQGTSVTVSS

4. El anticuerpo según la reivindicación 1 caracterizado porque la secuencia de la CDR-H1 se selecciona del grupo que consiste de:

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

5. El anticuerpo según la reivindicación 1 caracterizado porque la secuencia de la CDR-H2 se selecciona del grupo que consiste de:

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

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

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

CDR-H3 ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
CDR-H3 ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
CDR-H3 ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
CDR-H3 ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
CDR-H3 ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

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

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

CDR-H1 GYTFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 13
CDR-H1 GYPFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 14
CDR-H1 GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
CDR-H1 GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16

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

CDR-H3 ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
CDR-H3 ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
CDR-H3 ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
CDR-H3 ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
CDR-H3 ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CDR-H1 GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
CDR-H1 GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16

una secuencia de la CDR-H2 que se selecciona del grupo que consiste de:

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

una secuencia de la CDR-H3 que se selecciona del grupo que consiste de:

CDR-H3 ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
CDR-H3 ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
CDR-H3 ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
CDR-H3 ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
CDR-H3 ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

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

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

CDR-H1 GYSFKSYQIH, sec. con núm. de ident: 10
CDR-H1 GYSFTSYQIH, sec. con núm. de ident: 11
CDR-H1 GYRFTRYWIH, sec. con núm. de ident: 12
CDR-H1 GYTFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 13
CDR-H1 GYPFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 14
CDR-H1 GYSFSRYQIV, sec. con núm. de ident: 15
CDR-H1 GYHFTRYQIH, sec. con núm. de ident: 16

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

CDR-H3 ESPRLRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 34
CDR-H3 ESPRFRRGRYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 35
CDR-H3 ESPRMRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 36
CDR-H3 ESPRVRRGIYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 37
CDR-H3 ESPRLRRGLYYYAMDY, sec. con núm. de ident: 38

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

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

17. Un fragmento según la reivindicación 14 o 15 caracterizado porque es un fragmento de tipo (Fab)2.

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

19. Un a composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos que expresen los gangliósidos N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3, caracterizada porque comprende cualquiera de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 12 o los fragmentos derivados de éstos y un vehículo farmacéuticamente estable.

20. Un método de tratamiento de tumores malignos que expresen los gangliósidos N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3, caracterizado porque comprende la administración de la composición farmacéutica de la reivindicación 20 a un sujeto que lo necesite.

21. El método de la reivindicación 21 donde el sujeto es humano.

22. Un juego de reactivos para el diagnostico de enfermedades que expresen los gangliósidos N-acetil GM3 y/o N-glicolil GM3, caracterizado porque comprende cualquiera de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 12 o los fragmentos derivados de éstos.