



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 732**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01) **C12N 15/13** (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 47/48** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **A61K 35/00** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07848842 .6**

96 Fecha de presentación : **31.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2097453**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.09.2009**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra el receptor de tipo II de hormona antimulleriana humana (AMHR-II).**

30 Prioridad: **02.11.2006 EP 06291703**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.08.2011

73 Titular/es: **Institut National de la Sante et de la
Recherche Medicale (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Teulon, Isabelle y
Pelegrin, André**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 363 732 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra el receptor de tipo II de hormona antimulleriana humana (AMHR-II).

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales y a fragmentos de los mismos dirigidos contra el receptor de tipo II de hormona antimulleriana humana (AMHR-II) y a su uso para tratar y diagnosticar enfermedades cancerosas tales como cánceres de ovario.
- 10 **[0002]** El cáncer de ovario es la causa principal de malignidad ginecológica y es la quinta causa más común de muerte relacionada con cáncer en mujeres. Con una incidencia media de aproximadamente 10 por 100.000, un total de 1-2% de todas las mujeres europeas presentan un cáncer de ovario en algún punto de sus vidas (Black RJ y col. 1997).
- 15 **[0003]** Los tumores de células de la granulosa (TCG) dan cuenta de aproximadamente un 5% de los neoplasmas malignos del ovario y de un 70% de los tumores ováricos estromales de los cordones sexuales. Aunque su malignidad potencial es relativamente baja en los primeros años de la enfermedad, puede aparecer recurrencia hasta 30 años después de la eliminación quirúrgica de los tumores primarios (Singh-Ranger G y col. 2004). Si el diagnóstico se hace tempranamente, antes de que el tumor se haya extendido al peritoneo, el pronóstico de recurrencia puede mejorar significativamente con la eliminación quirúrgica completa (Dutertre M. y col., 2001).
- 20 **[0004]** Los cánceres epiteliales del ovario representan aproximadamente un 80% de todos los tumores de ovario. Cuando estos carcinomas se diagnostican en etapas tempranas, la tasa de supervivencia es de aproximadamente un 90%. Desgraciadamente, en el diagnóstico, aproximadamente un 75% de las mujeres tienen ya una diseminación intraabdominal de la enfermedad ("American Cancer Society Facts and Figures". 2001 www.cancer.org). En estos casos, la tasa de supervivencia es de aproximadamente un 20-25% a pesar del tratamiento apropiado (Rapkiewicz AV. y col. 2004).
- 25 **[0005]** Se han propuesto algunos marcadores moleculares para cáncer epitelial del ovario, especialmente la forma de antígeno canceroso 125 en circulación (CA125 o MUC16), que se sobreexpresa en aproximadamente un 80% de estos tumores. Sin embargo, la elevación de su nivel puede estar asociada a la menstruación y a afecciones benignas tales como endometriosis o enfermedad hepática.
- 30 **[0006]** Las estrategias terapéuticas principales usadas para cáncer epitelial del ovario son cirugía y quimioterapia. Por ejemplo, el cáncer de ovario se ha tratado generalmente con quimioterapia basada en cisplatino, pero a menudo recidiva debido a resistencia a cisplatino adquirida (Yahata, H. y col., 2002). Aunque la mayoría de pacientes pueden responder inicialmente a la quimioterapia con platino y paclitaxel, incluyendo respuestas completas, la tasa de recaída es de aproximadamente un 85% (Gordon AN y col. 2004). Se han desarrollado rápidamente nuevas terapias orientadas basadas en hormonas, factores antiangiogénicos y anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales incluyen oregovomab (OvaRex, AltaRex), un anticuerpo monoclonal de murino en investigación dirigido contra CA125, usado actualmente en ensayos clínicos como tratamiento inmunoterapéutico (Berek JS y col. 2004) y cetuximab, que está dirigido contra el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), expresado en 30 a 70% de los cánceres epiteliales del ovario (Ozols RF y col. 2004).
- 40 **[0007]** Por tanto, existe una importante necesidad de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer de ovario. Adicionalmente, hay una clara necesidad de identificar nuevas proteínas asociadas al cáncer de ovario para uso como biomarcadores sensibles y específicos para el diagnóstico de cáncer de ovario en sujetos vivos.
- 45 **[0008]** El receptor de tipo II de hormona antimulleriana está implicado en la regresión del conducto de Muller asociada al desarrollo del sistema reproductivo masculino. Este receptor se expresa frecuentemente en células de tumor epitelial del ovario humanas. Ya que se ha demostrado la capacidad de la AMH de inhibir el crecimiento de células de cáncer de ovario, el AMHR-II podría constituir por tanto una diana valiosa para inmunoterapia basada en anticuerpo.
- 50 **[0009]** Se ha estudiado la expresión de AMHR-II en modelos animales mediante la manipulación genética de la línea germinal de ratón. Dutertre y col. (2001) notificaron la expresión de un AMHR-II funcional en tumores de ovario de células de granulosa derivados de ratones transgénicos obtenidos mediante oncogénesis orientada usando una construcción oncogénica de SV40 promotora de AMH. En un modelo de ratón desarrollado recientemente, Conolly y col. (2003), usando una construcción del mismo oncogén bajo el control de la secuencia reguladora en dirección 5' de AMHR-II, demostraron que aproximadamente un 50% de los ratones femeninos desarrollaban cáncer epitelial del ovario. Masiakos y col. (1999) demostraron también la expresión de AMHR-II en líneas celulares de cáncer epitelial del ovario, en muestras de células ascíticas aisladas de pacientes y en tumores sólidos de pacientes con carcinoma de ovario. Estos investigadores notificaron también la expresión de AMHR-II en líneas de células cancerosas derivadas de otros tejidos tales como mama (Segev DL y col.; 2000) o próstata (Segev DL y col. 2002). Estos datos sugieren un perfil muy específico de AMHR-II en cánceres humanos, especialmente en tumores de ovario.
- 65

[0010] En 2004, Salhi y col. desarrollaron y caracterizaron un anticuerpo monoclonal (mAb) dirigido contra AMHR-II humano, y demostraron mediante inmunohistoquímica (IHC) la fuerte expresión de AMHR-II por tumores de células de granulosa humanos (GCT) y por células de Sertoli y Leydig en testículos humanos. Mostraron también
5 claramente la unión no competitiva del mAb 12G4 en tumores de células de granulosa que expresan un alto nivel del ligando natural (AMH), permitiendo por tanto el uso *in vivo* del mAb 12G4 en tumores que expresan AMHR-II.

[0011] Más recientemente, Yuan y col. (2006) describieron la selección de moléculas de scFv (fragmentos variables monocatenarios) humanas específicas de AMHR-II de una colección expuesta en fago de scFv no
10 inmunitarios. Sugirieron adicionalmente que las construcciones basadas en anticuerpo pueden proporcionar un medio altamente específico de orientarse a AMHR-II en células de carcinoma de ovario humano con el fin de diagnosticar y tratar esta enfermedad.

[0012] La solicitud internacional WO2005/005615 describe anticuerpos que tienen una afinidad de unión
15 específica por el receptor de tipo II de sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MISIIR), en particular anticuerpos Fv monocatenarios, y el uso de los mismos para tratar o diagnosticar cánceres.

[0013] La presente invención da una fuente disponible públicamente del anticuerpo monoclonal específico desarrollado por Salhi y col. (2004), que se designa por los inventores como mAb 12G4. Es más, se ha depositado
20 un hibridoma productor del mAb 12G4 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia), según los términos del Tratado de Budapest, el 26 de septiembre de 2006. El hibridoma depositado tiene el número de depósito CNCM I-3673. Los inventores han clonado y caracterizado también el dominio variable de las cadenas ligera y pesada de dicho mAb 12G4, y determinado por tanto las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo.

[0014] Además, los inventores han investigado mediante inmunohistoquímica usando el mAb 12G4 la
25 expresión de AMHR-II en secciones de tejido de diversos tumores. Por lo tanto, han demostrado el perfil de expresión específico de AMHR-II en cánceres de ovario, no solo en cánceres epiteliales del ovario, sino también en subtipos especiales tales como adenocarcinoma seroso y transparente y tumores de células de granulosa adultas, que pertenecen respectivamente a las proliferaciones epiteliales malignas y a los tumores estromales de los
30 cordones sexuales. Por tanto, mostraron que el AMHR-II podía representar un nuevo marcador de diagnóstico para cánceres positivos de AMHR-II y que podía usarse como diana para inmunoterapia, usando el mAb 12G4 o derivados del mismo.

[0015] Los inventores han demostrado recientemente mediante experimentos de inmunofluorescencia que el
35 mAb 12G4 muestra una internalización eficaz en la línea celular de TCG transfectada establemente con AMHR-II (COV434-pIRES-EGFP-AMHR-II) (Zhang H y col. 2000). Esta línea celular expresa aproximadamente 10^4 receptores/célula. Han mostrado también la capacidad *in vitro* de este anticuerpo de inhibir el crecimiento de células COV434 que expresan AMHR-II. Se han efectuado también experimentos *in vivo*, mostrando que el mAb 12G4 es
40 capaz de retardar el crecimiento tumoral en un modelo de ratones sin pelo atímicos xenoinjertados con células COV434-pIRESEGFP-AMHR-II.

[0016] Por tanto, un objeto descrito en la solicitud se refiere a una cadena pesada y/o ligera de
45 inmunoglobulina en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6 para CDR-1, las SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:7 para CDR-2 y las SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8 para CDR-3.

[0017] Otro objeto descrito en la solicitud se refiere a un anticuerpo monoclonal o a un fragmento del mismo
50 dirigido contra el receptor de tipo II de hormona antimulleriana (AMHR-II) que comprende:

una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:2 para CDR-H1, la secuencia SEQ ID NO:3 para CDR-H2 y la secuencia SEQ ID NO:4 para CDRH3; y/o

55 una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:6 para CDR-L1, la secuencia SEQ ID NO:7 para la región CDR-L2 y la secuencia SEQ ID NO:8 para CDR-L3.

[0018] Un primer aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por
60 receptor de tipo II de hormona antimulleriana humana (AMHR-II) que comprende

(a) una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2 para CDR-1, la SEQ ID NO: 3 para CDR-2 y la SEQ ID NO: 4 para CDR-3; y

(b) una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6 para CDR-1, la SEQ ID 7 para CDR-2 y la SEQ ID
65 NO: 8 para CDR-3.

[0019] Un segundo aspecto de la invención se refiere a un fragmento de un anticuerpo monoclonal de la invención seleccionado del grupo constituido por Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y fragmentos de diacuerpos.

5

[0020] Un tercer aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo según la invención.

[0021] Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico según la invención.

10

[0022] Un quinto aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora que se ha transformado con un ácido nucleico y/o un vector como se describe anteriormente.

[0023] Un sexto aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de producción de un anticuerpo según la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas consistentes en: (i) cultivar una célula hospedadora transformada como se describe anteriormente en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo y (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

15

[0024] Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo y/o ácido nucleico y/o vector, y/o una célula hospedadora según la invención, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

20

[0025] Un octavo aspecto de la invención se refiere a un inmunocombinado que comprende un anticuerpo según la invención combinado con un agente anticanceroso o un agente inhibidor del crecimiento.

25

[0026] Un noveno aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo según la invención que está marcado con una molécula o sustancia detectable.

[0027] Un décimo aspecto de la invención se refiere al uso de un anticuerpo, o composición farmacéutica o inmunocombinado según la invención, para la fabricación de un medicamento pretendido para tratar un cáncer de ovario.

30

[0028] Un undécimo aspecto de la invención se refiere al uso de un anticuerpo según la invención para diagnosticar y/o controlar cánceres de ovario.

35

Definiciones

[0029] Una "secuencia de codificación" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia nucleotídica que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, concretamente, la secuencia nucleotídica codifica una secuencia aminoacídica de ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia de codificación de una proteína puede incluir un codón de inicio (habitualmente ATG) y un codón de terminación.

40

[0030] Como se usa en la presente memoria, las referencias a proteínas específicas (por ejemplo, anticuerpos o AMHR-II) incluyen un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica nativa, así como variantes y formas modificadas, independientemente de su origen o modo de preparación. Una proteína que tiene una secuencia aminoacídica nativa es una proteína que tiene la misma secuencia aminoacídica que la obtenida a partir de la naturaleza (por ejemplo, un AMHR-II de origen natural). Dichas proteínas de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden prepararse usando procedimientos recombinantes y/o sintéticos estándares. Las proteínas de secuencia nativa incluyen formas variantes (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa), variantes alélicas de origen natural y formas que incluyen modificaciones postraduccionales. Una proteína de secuencia nativa incluye proteínas después de modificaciones postraduccionales tales como glucosilación o fosforilación, u otras modificaciones de algunos restos aminoacídicos.

45

50

55

[0031] El término "gen" significa una secuencia de ADN que codifica, o corresponde a, una secuencia particular de aminoácidos que comprende toda o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede incluir o no secuencias de ADN reguladoras, tales como secuencias promotoras, que determinan por ejemplo las condiciones en que se expresa el gen. Algunos genes, que no son genes estructurales, pueden transcribirse de ADN a ARN, pero no se traducen a una secuencia aminoacídica. Otros genes pueden funcionar como reguladores de los genes estructurales o como reguladores de la transcripción de ADN. En particular, el término gen puede entender la secuencia genómica que codifica una proteína, concretamente una secuencia que comprende secuencias reguladoras, promotoras, intrónicas y exónicas.

60

[0032] Como se usa en la presente memoria, el término "oligonucleótido" designa un ácido nucleico, generalmente de al menos 10, preferiblemente al menos 12, más preferiblemente al menos 15 y aún más preferiblemente al menos 20 nucleótidos, preferiblemente de no más de 100 nucleótidos, aún más preferiblemente

65

de no más de 70 nucleótidos.

[0033] "Variantes de función conservada" son aquellas en que ha cambiado un resto aminoacídico dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación global y función del polipéptido incluyendo, pero sin limitación, el
 5 reemplazo de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de unión a hidrógeno, ácida, básica, hidrófoba, aromática y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína, de modo que el porcentaje de similitud de secuencia proteica o aminoacídica entre dos proteínas cualesquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de 70 a 99% como se determina según un esquema de alineamiento de secuencia tal como el procedimiento Cluster, en el
 10 que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante de función conservada" incluye también un polipéptido que tiene al menos un 60% de identidad aminoacídica determinada por los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 85%, aún más preferiblemente al menos un 90%, y todavía más preferiblemente al menos un 95%, y que tiene las mismas o sustancialmente las mismas propiedades o funciones que la proteína nativa u original con la que se compara.

15 **[0034]** Dos secuencias aminoacídicas son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando son idénticos más de un 80%, preferiblemente más de un 85%, preferiblemente más de un 90%, de los aminoácidos, o son similares (funcionalmente idénticos) más de aproximadamente un 90%, preferiblemente más de un 95%, en toda la longitud de la secuencia más corta. Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se
 20 identifican mediante alineamiento usando, por ejemplo, el programa pileup de GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, versión 7, Madison, Wisconsin) o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencia tales como BLAST, FASTA, etc.

[0035] Según la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se usarán
 25 igualmente en la presente invención. Anticuerpo designa moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, concretamente, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo comprende no solo moléculas de anticuerpo enteras, sino también fragmentos de anticuerpo así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están
 30 ligadas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está ligada a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (l) y kappa (k). Hay cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene distintos dominios de secuencia. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios
 35 constantes (CH1, CH2 y CH3, colectivamente designados como CH). Las regiones variables de ambas cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad por el antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas tales como asociación a cadena de anticuerpo, secreción, movilidad transplacentaria, unión de complemento y unión a receptores de Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste
 40 en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están constituidos por restos que son principalmente de las regiones hipervariable o determinante de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, restos de regiones no hipervariables o estructurales (FR) influyen en la estructura del dominio global y por tanto en el sitio de combinación. Las regiones determinantes
 45 de la complementariedad o CDR designan secuencias aminoacídicas que definen conjuntamente la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión a inmunoglobulina nativo. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, designadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Por lo tanto, un sitio de unión a antígeno incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y ligera.

50 **[0036]** Las regiones estructurales (FR) designan las secuencias aminoacídicas interpuestas entre las CDR, concretamente, aquellas porciones de las regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina que están relativamente conservadas entre diferentes inmunoglobulinas en una sola especie, como se define por Kabat, y col. ("Sequences of Proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)). Como
 55 se usa en la presente memoria, una "región estructural humana" es una región estructural que es sustancialmente idéntica (aproximadamente un 85% o más, en particular un 90, 95 o 100%) a la región estructural de un anticuerpo humano de origen natural.

[0037] El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb", como se usa en la presente memoria, designa una
 60 molécula de anticuerpo de una sola composición aminoacídica, que está dirigida contra un antígeno específico y que se produce por un solo clon de linfocitos B o hibridoma.

[0038] El término "anticuerpo quimérico" designa un anticuerpo modificado por ingeniería genética que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, y un dominio CH y un dominio CL de otro anticuerpo, en particular un anticuerpo humano. Como animal no humano, puede usarse
 65 cualquier animal tal como ratón, rata, hámster, conejo o similar.

- [0039]** El término “anticuerpo humanizado” designa anticuerpos en que las regiones estructurales o “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina donante de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original. En una realización preferida, se injerta una CDR de ratón en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el “anticuerpo humanizado”.
- [0040]** “Fragmentos de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scfv, sc(Fv)₂, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. El término “Fab” denota un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, en que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y toda la cadena L, entre los fragmentos obtenidos tratando la IgG con la proteasa papaína, están unidos conjuntamente mediante un enlace disulfuro.
- [0041]** El término “F(ab')₂” designa un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido mediante un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con la proteasa pepsina.
- [0042]** El término “Fab” designa un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra de F(ab')₂.
- [0043]** Un polipéptido Fv monocatenario (“scFv”) es un heterodímero de VH::VL ligado covalentemente que se expresa habitualmente a partir de una fusión génica que incluye los genes que codifican VH y VL ligados por un ligador que codifica péptido. El fragmento scFv humano de la invención incluye CDR que se mantienen en la conformación apropiada, preferiblemente usando técnicas de recombinación genética.
- [0044]** “dsFv” es un heterodímero de VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes pueden formarse espontáneamente mediante la asociación de scFv monovalentes, o pueden generarse acoplando scFv monovalentes por un ligador peptídico, tal como sc(Fv)₂ divalentes.
- [0045]** El término “diacuerpos” designa fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios están forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.
- [0046]** El término “hibridoma” denota una célula que se obtiene sometiendo a un linfocito B, preparado inmunizando un mamífero no humano con un antígeno, a fusión celular con una célula de mieloma derivada de un ratón o similar, lo que produce un anticuerpo monoclonal deseado que tiene especificidad de antígeno.
- [0047]** El término “AMHR-II” denota el receptor de tipo II de hormona antimülleriana. El gen de AMHR-II se ha aislado en rata (Baarends WM y col. 1994), conejo (di Clemente N. y col. 1994), ser humano (hAMHR-II) (Imbeaud S y col. 1995) y ratón (mAMHR-II) (Behringer RR y col. 1990). Contiene 11 exones: los exones 1-3 codifican el dominio extracelular, compuesto por 127 aminoácidos en el receptor humano, y el exón 4 codifica el dominio transmembrana, compuesto por 26 aminoácidos. La secuencia predicha del AMHR-II comparte una similitud global de aproximadamente un 30% con otros receptores de tipo II de la familia de TGF-β. El AMHR-II se expresa específicamente en las dianas de tejido naturales, los órganos reproductivos y las gónadas. En el conducto de Müller, donde la AMH (hormona antimülleriana) induce la regresión mediante un mecanismo paracrino, se expresa el AMHR-II en el mesénquima (Tsuiji M y col. 1992). Las mutaciones en AMHR-II o AMH causan anomalías sexuales masculinas, por ejemplo pseudohermafroditismo, en ratones transgénicos macho (Behringer RR y col. 1990) (conocido como síndrome del conducto de Müller persistente (SCMP) en seres humanos (Belville C y col. 1999)). En hembras, la expresión de AMHR-II se mantiene todo lo largo del conducto de Müller, y se detecta en el útero normal y embarazado (Teixeira J y col. 1996). Los ratones hembra deficientes de AMHR-II o AMH son normales y tan fértiles como los adultos jóvenes. AMH y AMHR-II se coexpresan en las células de granulosa testicular de Sertoli y ováricas, y en células derivadas tales como Smat-1 (Dutertre M y col. 1997) y AT29C (Racing C y col. 1998), respectivamente. La expresión de AMHR-II solo se ha detectado en células de Leydig de roedores (Racine C, y col. 1998; Lee MM y col. 1999) y en células de de seres humanos (Masiakos PT y col. 1999), pero no en epitelio de superficie de ovario de murino (di Clemente y col. 1994; Baarends WM y col. 1995). La secuencia polipeptídica del AMHR-II humano está depositada en la base de datos de Genebank con el número de acceso U29700.
- [0048]** Se entiende por “purificado” y “aislado”, cuando se designa un polipéptido (concretamente, el fragmento de anticuerpo de la invención) o una secuencia nucleotídica, que la molécula indicada está presente en

ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término “purificado”, como se usa en la presente memoria, significa preferiblemente que están presentes al menos un 75% en peso, más preferiblemente al menos un 85% en peso, más preferiblemente aún al menos un 95% en peso, y lo más preferiblemente al menos un 98% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica un polipéptido particular designa una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente exenta de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido en cuestión; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afecten perjudicialmente a las características básicas de la composición.

[0049] Como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” denota un mamífero, tal como un roedor, felino, cánido y primate. Preferiblemente es un sujeto según la invención un ser humano.

Anticuerpos, cadenas de inmunoglobulina y polipéptidos de la invención:

[0050] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados o fragmentos de los mismos que están dirigidos contra AMHR-II humano. En particular, los inventores han depositado el hibridoma productor de mAb 12G4 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia), según los términos del Tratado de Budapest, el 26 de septiembre de 2006. El hibridoma depositado tiene un número de depósito CNCM I-3673. Los inventores han clonado y caracterizado el dominio variable de las cadenas ligera y pesada de dicho mAb 12G4, y determinado por tanto el dominio de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo como se describe en la Tabla 1 y en las Figuras 2 y 3.

Tabla 1: Dominios de VH, VL y CDR del mAb12G4:

Dominios del mAb 12G4	Secuencia
VH	QVQLQ QSGPE LVKPG ASVRM SCKAS GYTFT SYHIH WVKQR PGQGL EWIGW IYPGD DSTKY NEKFK GKTTL TADKS SSTAY MLLSS LTSED SAIYF CTRGD RFAYW GQGTL VTVSA (SEQ ID NO:1)
CDR1 de VH	GYTFT SYH (SEQ ID NO:2)
CDR2 de VH	ITPGD DST (SEQ ID NO:3)
CDR3 de VH	TRGDR FAY (SEQ ID NO:4)
VL	QIVLT QSPAI MSASL GEGIT LTCSA SSSVR YIHWY QQKSG TSPKL LIYST SNLAS GVPSR FSGSG SGTFH SLTISS VEAED AADYY CLQWS SYPWT FGGGT KLEIK (SEQ ID NO:5)
CDR1 de VL	SSVRY (SEQ ID NO:6)
CDR2 de VL	STS (SEQ ID NO:7)
CDR3 de VL	LQWSS YPWT (SEQ ID NO:8)

[0051] Por lo tanto, la solicitud da a conocer un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por AMHR-II humano, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:2 para CDR-H1, la SEQ ID NO:3 para CDR-H2 y la SEQ ID NO:4 para CDR-H3.

[0052] La solicitud da a conocer también un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por AMHR-II humano, que comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:6 para CDR-L1, la SEQ ID NO:7 para CDR-L2 y la SEQ ID NO:8 para CDR-L3.

[0053] La solicitud describe también un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por AMHR-II humano, que comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6 para CDR-H1, la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:7 para CDR-H2 y la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8 para CDR-H3; y/o una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:6 para CDR-H1, la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:7 para CDR-H2 y la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8 para CDR-H3.

[0054] El anticuerpo monoclonal descrito en la solicitud puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:2 para CDR-H1, la SEQ ID NO:3 para CDR-H2 y la SEQ ID NO:4 para CDR-H3 y/o una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:6 para CDR-L1, la SEQ ID NO:7 para CDR-L2 y la SEQ ID NO:8 para CDR-L3.

[0055] El anticuerpo monoclonal descrito en la solicitud puede comprender una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:2 para CDR-H1, la SEQ ID NO:3 para CDR-H2 y la SEQ ID NO:4 para CDR-H3 y/o una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:6 para CDR-L1, la SEQ ID NO:7 para CDR-L2 y la SEQ ID NO:8 para CDR-L3. En

particular, la solicitud describe un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de tipo II de hormona antimulleriana (AMHR-II) que comprende:

- una cadena pesada en la que el dominio variable comprende
 - 5 a) la SEQ ID NO:2 en la región CDR-H1, la SEQ ID NO:3 en la región CDR-H2 y la SEQ ID NO:4 en la región CDR-H3; o
 - b) la SEQ ID NO:6 en la región CDR-H1, la SEQ ID NO:7 en la región CDR-H2 y la SEQ ID NO:8 en la región CDR-H3,
- 10 - una cadena ligera en la que el dominio variable comprende
 - c) la SEQ ID NO:6 en la región CDR-L1, la SEQ ID NO:7 en la región CDR-L2 y la SEQ ID NO:8 en la región CDR-L3; o
 - d) la SEQ ID N:2 en la región CDR-L1, la SEQ ID NO:3 en la región CDR-L2 y la SEQ ID NO:4 en la región CDR-L3.

15 **[0056]** En una realización particular, el dominio variable de cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia aminoacídica expuesta como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:5 y/o el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica expuesta como SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO:1.

20 **[0057]** Dichos anticuerpos pueden producirse mediante cualquier técnica bien conocida en la materia. En particular, dichos anticuerpos se producen mediante técnicas como se describen en adelante.

[0058] Según una realización, el anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo de murino. En particular, dicho anticuerpo de murino puede ser obtenible a partir del hibridoma disponible en la CNCM con número
25 de depósito I-3673.

[0059] En otra realización, el anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo quimérico, preferiblemente un anticuerpo quimérico de ratón/humano. En particular, dicho anticuerpo quimérico de ratón/humano puede comprender los dominios variables de un anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado
30 como CNCM-I-3673.

[0060] En otra realización, el anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo humanizado. En particular, en dicho anticuerpo humanizado, el dominio variable comprende regiones estructuralesceptoras humanas y, opcionalmente, un dominio constante cuando está presente, y CDR donantes no humanas tales como
35 CDR de ratón, como se definen anteriormente.

[0061] La invención proporciona además fragmentos de dichos anticuerpos monoclonales que incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
40

[0062] En otro aspecto, la solicitud describe una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:6 para CDR-1, la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:7 para CDR-2 y la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8 para CDR-3.
45

[0063] En particular, la solicitud describe una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina en la que el dominio variable comprende:

- al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:2 para CDR-1, la SEQ ID NO:3 para CDR-2 y la SEQ ID NO:4 para CDR-3; o
- al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO:6 para CDR-1, la SEQ ID NO:7 para CDR-2 y la SEQ ID NO:8 para CDR-3.

[0064] La solicitud describe también una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina en la que el dominio
55 variable comprende:

- la SEQ ID NO:2 para CDR-1, la SEQ ID NO:3 para CDR-2 y la SEQ ID NO:4 para CDR-3; o
- la SEQ ID NO:6 para CDR-1, la SEQ ID NO:7 para CDR-2 y la SEQ ID NO:8 para CDR-3.

60 **[0065]** Según una realización, una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina descrita en la solicitud comprende un dominio variable que tiene la secuencia aminoacídica expuesta como SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:5.

[0066] En una realización, una cadena de inmunoglobulina descrita en la solicitud es una cadena pesada o una cadena ligera.
65

[0067] La solicitud describe además una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada o ligera de

inmunoglobulina según la invención. En particular, la inmunoglobulina puede comprender cadenas pesadas o ligeras como se definen anteriormente.

5 **[0068]** En otro aspecto la solicitud da a conocer polipéptidos que tienen una secuencia seleccionada del grupo constituido por la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8.

10 **[0069]** Los anticuerpos y polipéptidos de la invención pueden usarse en forma aislada (por ejemplo purificados) o contenidos en un vector, tal como una vesícula de membrana o lipídica (por ejemplo, un liposoma).

Ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras recombinantes

15 **[0070]** Un objeto adicional de la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal de la invención o un fragmento del mismo.

[0071] En una realización particular la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio VH del mAb 12G4 o el dominio VL del mAb 12G4.

20 **[0072]** Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o vector vírico.

25 **[0073]** Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el portador mediante el que puede introducirse una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula hospedadora, de forma que se transforme el hospedador y promueva la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

[0074] Así, un objeto adicional de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

30 **[0075]** Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho polipéptido tras administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor y potenciador tempranos de SV40 (Mizukami T. y col. 1987), el promotor y potenciador LTR de virus de leucemia de ratón de Moloney (Kuwana Y y col. 1987), el promotor (Mason JO y col. 1985) y potenciador (Gillies SD
35 y col. 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

[0076] Puede usarse cualquier vector de expresión para células animales, a condición de que el gen que codifica la región C del anticuerpo humano pueda insertarse y expresarse. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H y col. 1990), pAGE103 (Mizukami T y col. 1987), pHSG274 (Brady G y col. 1984), pKCR
40 (O'Hare K y col. 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H y col. 1990) y similares.

[0077] Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR, y similares.

45 **[0078]** Otros ejemplos de vector vírico incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, herpesvíricos y de AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la materia, tales como transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Pueden encontrarse protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes defectivos de
50 replicación, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

[0079] Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una célula que se ha transfectado, infectado o transformado con un ácido nucleico y/o un vector según la invención.

55 **[0080]** El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "extraño" (concretamente extrínseco o extracelular) en una célula hospedadora, de modo que la célula hospedadora exprese el gen o secuencia introducido produciendo una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducido. Una célula hospedadora que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha
60 "transformado".

[0081] Los ácidos nucleicos de la invención pueden usarse para producir un polipéptido recombinante de la invención en un sistema de expresión adecuado. El término "sistema de expresión" significa una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por el
65 ADN extraño portado por el vector e introducido en la célula hospedadora.

[0082] Los sistemas de expresión comunes incluyen células hospedadoras de *E. coli* y vectores plasmídicos, células hospedadoras de insecto y vectores baculovíricos, y células hospedadoras y vectores de mamífero. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación, células procarióticas (tales como bacterias) y células eucarióticas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células de planta, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, las levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos de células de mamífero primarias o establecidas (por ejemplo, producidas a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos incluyen también células de ratón SP2/0-Ag14 (ATCC CRL1581), células de ratón P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL1580), células CHO que son defectivas del gen de dihidrofolato reductasa (designado de aquí en adelante como el "gen DHFR") (Urlaub G y col.; 1980), células de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL1662, designadas de aquí en adelante como "células YB2/0") y similares. Se prefieren las células YB2/0, puesto que la actividad de ADCC de los anticuerpos quiméricos o humanizados está potenciada cuando se expresa en esta célula.

[0083] La presente solicitud da a conocer también un procedimiento de producción de una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo o polipéptido de la invención según la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas consistentes en: (i) la introducción *in vitro* o *ex vivo* de un ácido nucleico recombinante o un vector como se describe anteriormente en una célula hospedadora competente, (ii) el cultivo *in vitro* o *ex vivo* de la célula hospedadora recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, la selección de las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo o polipéptido. Dichas células hospedadoras recombinantes pueden usarse para la producción de anticuerpos y polipéptidos de la invención.

Procedimientos de producción de anticuerpos de la invención:

[0084] Los anticuerpos y polipéptidos de la invención pueden producirse mediante cualquier técnica conocida en la materia tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación.

[0085] Conociendo la secuencia aminoacídica de la secuencia deseada, un especialista en la materia puede producir fácilmente dichos anticuerpos o polipéptidos mediante técnicas estándares para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando el procedimiento en fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis peptídica comercialmente disponible (tal como el preparado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Como alternativa, los anticuerpos y polipéptidos de la invención pueden sintetizarse mediante técnicas de ADN recombinante como es bien conocido en la materia. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el (poli) péptido deseado a vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucarióticos o procarióticos adecuados que expresen el polipéptido deseado, del que pueden aislarse después usando técnicas bien conocidas.

[0086] En particular, la invención se refiere además a un procedimiento de producción de un anticuerpo o polipéptido de la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas consistentes en: (i) cultivar una célula hospedadora transformada según la invención en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo o polipéptido y (ii) recuperar el anticuerpo o polipéptido expresado.

[0087] Los anticuerpos y polipéptidos de la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

[0088] En una realización particular, el anticuerpo quimérico humano de la presente invención puede producirse obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios VL y VH como se describen anteriormente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolos en un vector de expresión para células animales que tenga genes que codifican la CH de anticuerpo humano y la CL del anticuerpo humano, y expresando la secuencia de codificación introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

[0089] Como dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a la inmunoglobulina humana, pero aquellas de la clase IgG son adecuadas y pueden usarse también cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Además, como CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y pueden usarse las de clase kappa o clase lambda.

[0090] Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos que implican técnicas de ADN recombinante y transfección génica convencionales son bien conocidas en la materia (véanse Morrison SL. y col. (1984) y los documentos de patente US 5.202.238 y US 5.204.244).

[0091] El anticuerpo humanizado de la presente invención puede producirse obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican dominios de CDR, como se describen anteriormente, construyendo un vector de expresión de

anticuerpo humanizado insertándolos en un vector de expresión para células animales que tenga genes que codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y expresando los genes introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

5

[0092] El vector de expresión de anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en que existen en vectores separados un gen que codifica una cadena pesada del anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo, o de un tipo en que ambos genes existen en el mismo vector (de tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L de anticuerpo en células animales, se prefiere el vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem (Shitara K y col. 1994). Los ejemplos de vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem incluyen pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 y similares.

10

[0093] Los procedimientos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas de ADN recombinante y transfección génica convencionales son bien conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, Riechmann L. y col. 1988; Neuberger MS y col. 1985). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la materia que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; patentes de EE.UU. n.º 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), revestimiento o remodelación de superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM y col. (1994); Roguska MA. y col. (1994)) e intercambio de cadenas (patente de EE.UU. n.º 5.565.332). La tecnología de ADN recombinante general para la preparación de dichos anticuerpos es también conocida (véanse la solicitud de patente europea EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576).

20

[0094] El Fab de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con AMHR-II humano con una proteasa, la papaína. Además, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica Fab del anticuerpo en un vector para un sistema de expresión procariótico, o para un sistema de expresión eucariótico, e introduciendo el vector en un procarionte o eucariota (según sea apropiado) para expresar el Fab.

30

[0095] El $F(ab')_2$ de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con ARMHR-II con una proteasa, la pepsina. El $F(ab')_2$ puede producirse también uniendo el Fab' descrito a continuación por un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

35

[0096] El Fab' de la presente invención puede obtenerse tratando $F(ab')_2$ que reacciona específicamente con hAMHR-II con un agente reductor, el ditiotreitól. El Fab' puede producirse también insertando ADN que codifica un fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariontes, o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procarionte o eucariota (según sea apropiado) para efectuar su expresión.

40

[0097] El scFv de la presente invención puede producirse obteniendo ADNc que codifica los dominios de VH y VL como se describen anteriormente, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariontes, o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procarionte o eucariota (según sea apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento de scFv humanizado, puede usarse una tecnología bien conocida denominada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un fragmento de scFv donante e injertarlas en un fragmento de scFv estructural humano de estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, los documentos W098/45322; WO 87/02671; US 5.859.205; US 5.585.089; US 4.816.567; EP0173494).

45

Modificación de los anticuerpos de la invención

50

[0098] Se contemplan modificaciones de la secuencia aminoacídica de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Es conocido que, cuando se produce un anticuerpo humanizado injertando simplemente CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en FR de VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión a antígeno se reduce en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios restos aminoacídicos de VH y VL del anticuerpo no humano, no solo en las CDR sino también en las FR, están asociados directa o indirectamente con la actividad de unión a antígeno. Por tanto, la sustitución de estos restos aminoacídicos por diferentes restos aminoacídicos derivados de FR de VH y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Para resolver el problema, en anticuerpos injertados con CDR humanas, se han hecho intentos de identificar, entre las secuencias aminoacídicas de FR y de VH y VL de anticuerpos humanos, un resto aminoacídico que esté asociado directamente a la unión a anticuerpo, o que interaccione con un resto aminoacídico de CDR, o que mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté asociado directamente a la unión al antígeno. La actividad de unión a antígeno reducida podría aumentarse reemplazando los aminoácidos identificados por restos aminoacídicos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

60

[0099] Pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente

65

invención, y en las secuencias de ADN que los codifican, y seguir obteniéndose una molécula funcional que codifica un anticuerpo y polipéptido con las características deseables.

[0100] Los cambios de aminoácido pueden conseguirse cambiando codones en la secuencia de ADN, según la Tabla 2.

Tabla 2

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA, GCC, GCG, GCU
Cisteína	Cys	C	UGC, UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC, GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA, GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC, UUU
Glicina	Gly	G	GGA, GGC, GGG, GGU
Histidina	His	H	CAC, CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA, AUC, AUU
Lisina	Lys	K	AAA, AAG
Leucina	Leu	L	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC, AAU
Prolina	Pro	P	CCA, CCC, CCG, CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA, CAG
Arginina	Arg	R	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
Serina	Ser	S	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
Treonina	Thr	T	ACA, ACC, ACG, ACU
Valina	Val	V	GUA, GUC, GUG, GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAU

[0101] En la realización de cambios en las secuencias aminoacídicas del polipéptido, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. Se entiende en general en la materia la importancia del índice aminoacídico hidropático para conferir función biológica interactiva a una proteína. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basado en su hidrofobicidad y características de carga, estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (< 3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9) y arginina (-4,5).

[0102] Un objeto adicional de la presente invención comprende también variantes de función conservada de los anticuerpos de la presente invención.

[0103] Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin una pérdida de actividad apreciable. Puesto que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen la actividad funcional biológica de la proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones aminoacídicas en una secuencia proteica y, por supuesto, en su secuencia de codificación de ADN, obteniendo no obstante una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de anticuerpos de la invención, o las correspondientes secuencias de ADN que codifican dichos polipéptidos, sin una pérdida apreciable de su actividad biológica.

[0104] Es conocido en la materia que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropáticos similares y seguir dando como resultado una proteína de actividad biológica similar, concretamente, seguir obteniendo una proteína funcional y biológicamente equivalente.

[0105] Como se esboza anteriormente, las sustituciones aminoacídicas están basadas generalmente por lo tanto en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral aminoacídica, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen en consideración varias de las características anteriores son bien conocidas por los especialistas en la materia e incluyen: arginina y lisina, glutamato y aspartato, serina y treonina, glutamina y asparagina y valina, leucina e isoleucina.

[0106] Puede ser también deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a su función efectora, por ejemplo, de modo que se potencie la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones aminoacídicas en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa, o adicionalmente, pueden introducirse un residuo o residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de un enlace disulfuro intercatenario en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de

internalización mejorada y/o una citotoxicidad mediada por complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas (Caron PC. y col. 1992 y Shopes B. 1992).

[0107] Otro tipo de modificación aminoacídica del anticuerpo de la invención puede ser útil para alterar el patrón de glucosilación original del anticuerpo.

[0108] Se entiende por “alterar” eliminar uno o más restos carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

[0109] La glucosilación de los anticuerpos está típicamente ligada por N. “Ligado por N” designa la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento de la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia aminoacídica de tal modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados por N).

[0110] Otro tipo de modificación covalente implica acoplar química o enzimáticamente glucósidos con el anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedadora que tenga capacidades de glucosilación para la glucosilación ligada por N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrido libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los del fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Por ejemplo, dichos procedimientos se describen en el documento WO87/05330.

[0111] La eliminación de cualquier resto carbohidrato presente en el anticuerpo puede realizarse química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar de ligamiento (*N*-acetilglucosamina o *N*-acetilgalactosamina), dejando el anticuerpo intacto. Se describe la desglucosilación química por Sojahr H. y col. (1987) y por Edge, AS. y col. (1981). La escisión enzimática de los restos carbohidrato en los anticuerpos puede conseguirse mediante el uso de una variedad de endo- y exoglucosidasas como se describe por Thotakura, NR. y col. (1987).

[0112] Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende ligar el anticuerpo con uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de EE.UU. nº 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 o 4.179.337.

Inmunconjugados:

[0113] La invención se refiere a inmunconjugados que comprenden un anticuerpo de la invención conjugado con un agente anticanceroso tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.

[0114] Un “agente inhibidor del crecimiento”, cuando se usa en la presente memoria, designa un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula de cáncer de ovario, *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular, tales como agentes que inducen la detención en fase G1 y la detención en fase M. Los bloqueantes en fase M clásicos incluyen los alcaloides de vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 se extienden también a la detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato y 5-fluorouracilo. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblado de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en células.

[0115] El término “agente citotóxico”, como se usa en la presente memoria, designa una sustancia que inhibe o evita la función de células y/o que causa la destrucción de células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos del Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, anticuerpos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, por ejemplo, gelonina, ricina, saporina y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos dados a conocer a continuación. Se describen a continuación otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

[0116] La conjugación de los anticuerpos de la invención con agentes citotóxicos o agentes inhibidores del crecimiento puede realizarse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales incluyendo, pero sin limitación, (2-piridilditio)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP), (*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bisazido (tales como bis-(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bisazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de fluoro bisactivos (tales como 1,5-difluoro-2,4-nitrobenzono). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricino como se describe en Vitetta y col. (1987). El ácido 1-isotiocianatobencilmetildietilentiainopentaacético marcado con carbono (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleido con el anticuerpo (documento WO 94/11026).

[0117] El ligador puede ser un "ligador escindible", que facilita la liberación del agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil por ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.208.020).

[0118] Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender las regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0119] Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse también en terapia mediada por profármacos dependiente de enzima mediante la conjugación del anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco anticanceroso activo (véanse, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE.UU. nº 4.975.278). El componente enzimático del inmunconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal modo que lo convierta en su forma citotóxica más activa. Las enzimas que son útiles en el procedimiento de esta invención incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir flurocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoacídicos; enzimas de escisión de carbohidrato tales como O-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa útiles para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Las enzimas pueden estar unidas covalentemente con los anticuerpos mediante técnicas bien conocidas en la materia tales como el uso de reactivos de reticulación heterobifuncionales debatidos anteriormente.

Procedimientos y usos de diagnóstico:

[0120] Un objeto adicional de la invención se refiere al uso de un anticuerpo de la invención para diagnosticar y/o controlar una enfermedad cancerosa con expresión de AMHR-II. Las enfermedades cancerosas asociadas a la expresión de AMHR-II incluyen típicamente cánceres de ovario, incluyendo tumores de células de granulosa y cánceres epiteliales del ovario.

[0121] En una realización preferida, los anticuerpos de la invención pueden estar marcados con una molécula o sustancia detectable tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcaje conocido en la materia. Los marcajes son conocidos en la materia y generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal.

[0122] Como se usa en la presente memoria, el término "marcado", con respecto al anticuerpo, se entiende que comprende el marcado directo del anticuerpo mediante acoplamiento (concretamente, ligamiento físico) del anticuerpo con una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)), así como marcado indirecto del anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable.

[0123] Un anticuerpo de la invención puede marcarse con una molécula radiactiva mediante cualquier procedimiento conocido en la materia. Por ejemplo, las moléculas radiactivas incluyen, pero sin limitación, átomos radiactivos para estudios de gammagrafía tales como I^{123} , I^{124} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} . Los anticuerpos de la invención pueden marcarse también con un marcador de espín para la formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida por formación de imágenes por resonancia magnética, IRM), tales como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0124] Una "muestra biológica" comprende una variedad de tipos de muestra obtenidos a partir de un sujeto y pueden usarse en un ensayo de diagnóstico o control. Las muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido tales como un espécimen de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de los mismos, y la progenie de los mismos. Por ejemplo, las muestras biológicas incluyen células obtenidas a partir de una muestra de tejido recogida de un individuo sospechoso de tener una enfermedad cancerosa asociada a la expresión de AMHR-II, y en una realización preferida, del ovario. Por lo tanto, las muestras biológicas comprenden muestras clínicas, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejido.

[0125] Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para estadificar las enfermedades cancerosas asociadas a la expresión de AMHR-II (por ejemplo, en formación de imágenes radiológicas). Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para estadificar un cáncer de ovario. Pueden usarse solos o en combinación con otros marcadores de cáncer de ovario incluyendo, pero sin limitación, CAI 25, HE4 y mesotelina.

[0126] El término "detección", como se usa en la presente memoria, incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medida) con o sin referencia a un control.

[0127] En otro aspecto, la invención es un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad cancerosa asociada a la expresión de AMHR-II en un sujeto mediante la detección de AMHR-II en células del sujeto usando el anticuerpo de la invención. En particular, dicho procedimiento de diagnóstico puede comprender las etapas consistentes en:

(a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto que es probable que padezca una enfermedad cancerosa asociada a la expresión de AMHR-II con un anticuerpo según la invención en condiciones suficientes para que el anticuerpo forme complejos con células de la muestra biológica que expresa AMHR-II;

(b) detectar y/o cuantificar dichos complejos, con lo que la detección de dichos complejos es indicativa de enfermedad cancerosa asociada a la expresión de AMHR-II.

[0128] Para controlar la enfermedad cancerosa, el procedimiento de diagnóstico según la invención puede repetirse a diferentes intervalos de tiempo, para determinar si la unión de anticuerpo a las muestras aumenta o disminuye, con lo que se determina si la enfermedad cancerosa progresa o remite.

Procedimientos y usos terapéuticos

[0129] Los anticuerpos, fragmentos o inmunoconjugados de la invención pueden ser útiles para tratar cualquier enfermedad cancerosa asociada a la expresión de AMHR-II humano. Los anticuerpos de la invención pueden usarse solos o en combinación con cualquier agente adecuado.

[0130] Es bien conocido que los anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden conducir al agotamiento de células que portan el antígeno reconocido específicamente por el anticuerpo. Este agotamiento puede estar mediado por al menos tres mecanismos: citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC), lisis dependiente de complemento e inhibición antitumoral directa del crecimiento tumoral mediante señales dadas a través del antígeno diana para el anticuerpo.

[0131] "Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" designa la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta de complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento a anticuerpos que están unidos a su antígeno asociado. Para valorar la activación del complemento, puede efectuarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col. (1997).

[0132] "Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" o "ADCC" designa una forma de citotoxicidad en que los anticuerpos secretados unidos a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilitan a estas células efectora citotóxicas unirse específicamente a una célula diana portadora de antígeno y, posteriormente, destruir la célula diana. Para valorar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede efectuarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como se describe en las patentes de EE.UU. n° 5.500.362 o 5.821.337.

[0133] En otra realización, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con un agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico o enzima activadora de profármaco como se describe anteriormente. Es más, los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para orientar dicho agente inhibidor del crecimiento, agente citotóxico o profármaco a la célula tumoral que expresa AMHR-II.

[0134] Por tanto, un objeto de la invención se refiere a un procedimiento para tratar una enfermedad cancerosa asociada a la expresión de AMHR-II, que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de un fragmento de anticuerpo o inmunoconjugado de la invención.

[0135] Las enfermedades cancerosas asociadas a la expresión de AMHR-II humano incluyen típicamente cánceres de ovario. En una realización preferida, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar cáncer de ovario, incluyendo tumores de células de granulosa y cánceres epiteliales del ovario.

5

[0136] En el contexto de la invención, el término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en la presente memoria, significa revertir, aliviar, inhibir la progresión de o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. Por el término “tratar cáncer de ovario”, como se usa en la presente memoria, se entiende la inhibición del crecimiento de células de cáncer de ovario. Preferiblemente, dicho tratamiento conduce también a la regresión del crecimiento tumoral, concretamente, a la reducción del tamaño de un tumor medible. Lo más preferiblemente, dicho tratamiento conduce a la regresión completa del tumor.

10

[0137] Según la invención, se entiende por el término “paciente” o “paciente necesitado de ello” un mamífero humano o no humano afectado o probablemente afectado por una enfermedad cancerosa con expresión de AMHR-II.

15

[0138] Se entiende por una “cantidad terapéuticamente eficaz” del polipéptido de la invención una cantidad suficiente del anticuerpo para tratar dicha enfermedad cancerosa, a una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los anticuerpos y composiciones de la presente invención será decidido por el facultativo a cargo dentro del alcance del criterio médico admitido. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno, la actividad del anticuerpo específico empleado, la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente, el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del anticuerpo específico empleado, la duración del tratamiento, los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado y factores similares bien conocidos en la medicina. Por ejemplo, es bien conocido dentro de las habilidades de la materia empezar por dosis del compuesto a niveles menores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado, y aumentar gradualmente la dosificación hasta alcanzar el efecto deseado.

20

25

[0139] Otro objeto de la invención se refiere al uso de al menos un anticuerpo, fragmento o inmunocombinado de la invención para la fabricación de un medicamento con el que se pretende tratar una enfermedad cancerosa asociada a la expresión de AMHR-II.

30

[0140] Los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con cualquier otra estrategia terapéutica para tratar cáncer de ovario (por ejemplo, radioterapia externa, quimioterapia o citocinas).

35

Composiciones farmacéuticas:

[0141] El polipéptido, ácidos nucleicos o conjugados de la invención pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida tales como polímeros biodegradables, formando composiciones terapéuticas.

40

[0142] “Farmacéuticamente” o “farmacéuticamente aceptable” designan entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable designa una carga, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

45

[0143] La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y sexo del paciente, etc.

50

[0144] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.

[0145] Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación apta para inyectar. Estas pueden ser en particular disoluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o disolución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

55

[0146] Las dosis usadas para administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante o, como alternativa, de la duración de tratamiento deseada.

60

[0147] Para preparar composiciones farmacéuticas, puede disolverse o dispersarse una cantidad eficaz del anticuerpo en un portador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

65

- [0148]** Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles, formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.
- [0149]** Pueden prepararse disoluciones en agua de los compuestos activos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables mezclados adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse también en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones de almacenamiento y uso ordinarias, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.
- [0150]** Un anticuerpo de la invención puede formularse en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, u ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden derivar también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.
- [0151]** El portador puede ser también un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. Puede causarse la prevención de la acción de los microorganismos por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede causarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- [0152]** Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida al disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de la disolución esterilizada por filtración previa del mismo.
- [0153]** La preparación de disoluciones más concentradas o altamente concentradas para inyección directa se contempla también, previéndose el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando altas concentraciones de los agentes activos a una pequeña área tumoral.
- [0154]** Tras la formulación, se administrarán las disoluciones de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero pueden emplearse también cápsulas de liberación de fármaco y similares.
- [0155]** Para administración parenteral en disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe tamponarse adecuadamente si es necesario, y volverse primero isotónico el diluyente líquido con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los especialistas en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, podría disolverse una dosificación en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Aparecerá necesariamente cierta variación de la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.
- [0156]** Los anticuerpos de la invención pueden formularse en una mezcla terapéutica que comprende de aproximadamente 0,0001 a 1,0 mg, o de aproximadamente 0,001 a 0,1 mg, o de aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 mg por dosis o así. Pueden administrarse también múltiples dosis.
- [0157]** Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para

administración oral, cápsulas de liberación retardada y cualquier otra forma usada actualmente.

[0158] En ciertas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de anticuerpos en células hospedadoras. La formación y uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos para los especialistas en la materia.

[0159] Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de aproximadamente 0,1 μm) se diseñan generalmente usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Se contemplan para uso en la presente invención nanopartículas de polialquilcianoacrilato biodegradables que satisfacen estos requisitos, y dichas partículas pueden prepararse fácilmente.

[0160] Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (VML)). Las VML tienen generalmente diámetros de 25 nm a 4 μm . La sonicación de VML da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (VUP) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una disolución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

20 Kits

[0161] Finalmente, la solicitud describe también kits que comprenden al menos un anticuerpo de la invención. Los kits que contienen anticuerpos de la invención encuentran uso en la detección de la expresión de AMHR-II, o en ensayos terapéuticos o de diagnóstico. Los kits de la invención pueden contener un anticuerpo acoplado con un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo de tejido o perlas (por ejemplo, perlas de Sepharose). Pueden proporcionarse kits que contienen anticuerpos para la detección y cuantificación de AMHR-II *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Dicho anticuerpo útil para detección puede dotarse con un marcaje tal como un marcaje fluorescente o radiomarcaje.

[0162] La invención se ilustrará además con vistas a las siguientes figuras y ejemplos.

FIGURAS

[0163]

La **Figura 1** muestra los productos de amplificación por PCR para las regiones de cadena (A) VH y (B) VK del mAb 12G4 usando una combinación de cebador constante apropiado y cebadores de señal correspondientes a una familia génica de VH o VK dada. Los conjuntos eficaces de cebadores deberían amplificar un producto de 450 pb por amplificación de VH y un producto de 390 pb por amplificación de VK.

La **Figura 2** muestra las secuencias nucleicas y aminoacídicas de la región VL del mAb 12G4.

La **Figura 3** muestra las secuencias nucleica y aminoacídica de la región VH del mAb 12G4.

La **Figura 4** muestra el análisis de citometría de flujo de la expresión de HER2 (línea gris) y la expresión de AMHR-II (línea negra) en la línea celular COV434-pIRES-EGFP-AMHR-II 1F3 transfectada establemente.

La **Figura 5** muestra el efecto antiproliferativo *in vitro* sobre la línea celular COV434-pIRES-EGFP-AMHR-II 1 F3 del mAb12G4, un mAb 35A7 específico y los mAb trastuzumab y FRP5 anti-HER2 medidos por el ensayo MTS. Se muestra un experimento representativo de cada dos.

La **Figura 6** muestra un estudio preliminar del efecto *in vivo* del mAb12G4 sobre el crecimiento de xenoinjertos de COV434-AMHRII-1F3 en ratones sin pelo atómicos. Curvas de Kaplan-Meier adaptadas que usan el tiempo tomado por el tumor para alcanzar el volumen determinado de 1200 mm^3 .

La **Figura 7** muestra el análisis de transferencia Western de la expresión de AMHR-II en xenoinjertos de COV434-AMHRII-1F3.

EJEMPLO 1:

A - MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:

[0164] **Síntesis de ADNc y amplificación por PCR de los genes de VH y VK de hibridoma de ratón:** Se extrajo el ARN total de 5×10^6 células de hibridoma 12G4 usando el kit RNeasy Mini (Qiagen) como se describe por el fabricante. Después de la extracción, se tomó una pequeña fracción de la preparación de ARN total para determinar la calidad de la muestra y el rendimiento de ARN total. Se efectuaron controles mediante espectroscopia UV para verificar la concentración y pureza del ARN. Se analizó el perfil de ARN total usando el kit Agilent RNA 6000 Nano LabChip[®] con el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) para determinar su cantidad

y su integridad. Se efectuó la síntesis de ADNc con 280 ng (1 µl) de ARN total usando el sistema de síntesis de primera hebra Superscript para PCR-FI (Invitrogen life Technologies) como se describe por el fabricante. Se cebó la reacción de síntesis del primer ADNc usando oligo(dT) para hibridar con las colas de 3'-poli(A). Se mantuvo el ADNc a -20°C hasta su uso.

5

[0165] Se llevó a cabo la amplificación por PCR en un volumen final de 20 µl que contenía 1 µl de reacción de síntesis de ADNc, dNTP 10 µM, 2 µl de tampón 10 X PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU.). Se establecieron 14 reacciones de PCR VH y 18 Vk usando cada grupo de cebadores 5' específicos de familia y la sonda oligonucleotídica 3' apropiada que coincidiera con los cebadores de la región constante de cadena ligera o pesada, RevCkSall y RevCySall, respectivamente. Los cebadores que se han usado son aquellos descritos por Chardes y col. (1999) (Véanse las tablas 1 y 2 de la referencia).

10

[0166] Se establecieron también dos mezclas, que contenían todos los cebadores 5' de VH o Vk. No se efectuó reacción de PCR con el cebador específico de la familia génica de VH13 (3609N), puesto que el único miembro notificado asignado a esta familia es el alelo no funcional de PC3609. La cantidad de cada cebador usado era inicialmente de 10 pM. Se calentaron las mezclas de reacción a 94°C durante 5 min, se añadieron entonces 2 U de ADN polimerasa Vent (New England Biolabs) y se llevaron a cabo 30 ciclos de amplificación durante 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 2 min a 72°C. Después de una extensión de 10 min a 72°C, se fraccionaron los productos de PCR mediante un gel de agarosa al 1,5% y se tiñeron con SYBR Green. Se seleccionaron conjuntos de cebadores 5' y 3' que conducían a un producto de 390 pb por amplificación de Vk y a un producto de 450 pb por amplificación de VH a partir de este cribado de PCR específico de familia. Se sometieron a una nueva PCR como se describe anteriormente 5 repeticiones usando los mismos cebadores seleccionados. Se purificaron en gel los productos de ADN amplificados por PCR en un gel de agarosa de baja temperatura de fusión al 1,5% (Gibco).

15

20

[0167] Secuenciación nucleotídica directa de los genes V amplificados: Se efectuó la secuenciación directa a partir de 500 ng de cada producto de PCR usando el servicio Value Read de reacciones de secuenciación estándares de MWG Biotech (Múnich, Alemania).

25

B – RESULTADOS

30

[0168] Se determinaron las secuencias de las regiones VH y VL del mAb 12G4 usando un procedimiento de amplificación eficaz y la secuenciación directa de regiones variables de ratón a partir de cualquier familia génica de inmunoglobulina (Strohal y col. 1987). Brevemente, los genes V de murina se han clasificado en 15 familias VH y 18 Vk, basándose en similitudes de secuencia aminoacídica y/o nucleotídica. En un intento de amplificar potencialmente genes de inmunoglobulina (Ig) de todas las familias de genes V, Strohal y col. han definido dos conjuntos originales de cebadores directos que hibridan con las secuencias señal relativamente conservadas de cada familia génica de cadena pesada y ligera. Estos cebadores se han usado rutinariamente en su laboratorio para amplificar y secuenciar directamente las regiones variables completas de nueve anticuerpos monoclonales de murino (mAb), incluyendo los dominios pertenecientes a siete familias génicas de Vk diferentes y cinco de VH. Su estrategia permite una secuenciación rápida y exacta de las regiones variables de cualquier familia génica de Ig y debería facilitar el diseño de anticuerpos quiméricos de interés clínico.

35

40

[0169] Análisis de ARN total: Se analizó el perfil de ARN total usando el kit Agilent RNA 6000 Nano LabChip[®] con bioanalizador Agilent 2100 para determinar su cantidad e integridad.

45

[0170] Amplificación por PCR de genes V de 12G4 de hibridoma de ratón usando cebadores de señal específicos de familia: La Figura 1 muestra los productos de amplificación por PCR de las regiones de cadena VH (A) y Vk (B) del mAb 12G4 usando una combinación de cebador constante apropiado y cebadores de señal correspondientes a una familia génica de VH o Vk dada. Los conjuntos eficaces de cebadores deberían amplificar un producto de 450 pb por amplificación de VH y un producto de 390 pb por amplificación de Vk. A partir del ADNc de células de hibridoma que secretan mAb 12G4 anti-AMHR-II (IgG1/k), se obtuvieron bandas mayoritarias del tamaño esperado (Figura 1):

50

- con el conjunto de cebadores de VH 1-J558 / RevCySall para amplificación de cadena pesada. No se obtuvo amplificación con los cebadores VH9 (VGam 3-8), VH10, VH11, VH12, VH14 ni VH15.

55

- con el conjunto de cebadores para amplificación de Vk Vk4/5/RevCkSall o Vk21/RevCkSall.

[0171] Caracterización génica de las regiones variables del mAb 12G4 después de secuenciación directa de los productos de amplificación: Un análisis adicional de los genes ensamblados mediante secuenciación directa de los productos de amplificación mostró que el gen VH pertenece a la familia génica principal VH (VH1). Se determinó que la familia génica Vk4/5 era la familia génica que codifica el gen Vk12G4. El producto de PCR de Vk amplificado con los cebadores Vk21 corresponde a una cadena ligera kappa redispuesta no funcionalmente transcrita en líneas celulares de mieloma, como NS1, derivadas del tumor MOPC21 original (Chardès y col. 1999). Dentro de cada familia génica, se ha identificado el gen de la línea germinal más cercana por las regiones variables secuenciadas usando la base de datos IMGT. Las secuencias de las regiones VL y VH se muestran en la Figuras 2 y 3, respectivamente.

60

65

EJEMPLO 2:**A- MATERIAL****Anticuerpos monoclonales:**

5 [0172] **mAb 12G4 anti-AMHR-II:** Se usó como inmunógeno el dominio extracelular recombinante de AMHR-II humano (ECD-hAMHR-II), expresado en bacterias y purificado como una proteína de fusión con cola de His (Gouedard L. y col., 2000). Se generaron hibridomas de ratón inmunizando ratones BALB/c cuatro veces i.p. a intervalos de 3 semanas con 20 µg de proteína en coadyuvante completo de Freund (Sigma) para la primera
10 inyección, y coadyuvante incompleto de Freund (Sigma) para las posteriores inyecciones. Se administró una inyección i.v. de recuerdo de ECD-hAMHR-II tres semanas después de la cuarta inmunización. Tres días después, se fusionaron células de bazo de ratones inmunizados con la línea celular de mieloma de ratón P3-X63-Ag.8.653. Se cribaron los sobrenadantes de los clones recién generados mediante ELISA usando ECD-hAMHR-II. Se confirmó la especificidad por hAMHR-II de los sobrenadantes mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS)
15 de células positivas de AMHR-II.

[0173] **mAb anti-HER2:** Se usaron los mAb de murino FRP5 (Harweth I. y col., 1992) y trastuzumab humanizado (Herceptin®). Se adquirió el trastuzumab (Herceptin®) en Genentech, Inc. (San Francisco, CA, EE.UU.).
20

[0174] **mAb usados como controles:** En experimentos de control, se usaron como anticuerpos irrelevantes anticuerpo monoclonal 35A7 anti-CEA (específico del epítipo CEA Gold 2 (Haskell C. y col. 1983; Hammarstrom S. y col., 1989) y PX (IgG1 de ratón normal purificada a partir del mieloma de ratón P3-X63 (Köhler G. 1975)). Se purificaron todos los mAb de IgG1 de murino a partir de fluido ascítico de hibridoma de ratón mediante precipitación
25 con sulfato de amonio (saturación al 45% a 4°C), seguida de cromatografía de intercambio iónico en celulosa DE52 (Whatman, Balston, Reino Unido).

[0175] **Líneas celulares y condiciones de cultivo:** La línea celular de tumor de granulosa humano COV434 se proporcionó amablemente por el equipo de van den Berg-Bakker (van den Berg-Bakker C. y col., 1993). Para
30 obtener la línea celular COV434-AMHR-II 1 F3 transfectada positivamente con AMHR-II, se transfectó establemente la línea celular COV34 de tumor TCG con el ADNc codificante de AMHR-II humano usando el vector pIRES-EGFP (kit de transfección FuGENE 6, Roche Diagnostics) y se subclonó entonces la línea celular COV434-AMHR-II 1 F3.

[0176] Se cultivaron todas las líneas celulares en medio DMEM F12 que contenía 10% de suero fetal bovino
35 termoinactivado, estreptomycin (0,1 mg/ml), penicilina (0,1 UI/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml). Se cultivaron las células a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y se reemplazó el medio dos veces por semana. Se realizó la recogida de las células usando tripsina (0,5 mg/ml) y EDTA (0,2 mg/ml). Se adquirieron todos los suplementos de medio de cultivo en Life Technologies, Inc. (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Para las células transfectadas, se añadió geneticina (al 0,67%) al medio.
40

B- PROCEDIMIENTOS Y RESULTADOS

[0177] **Análisis de citometría de flujo de la línea celular COV434-AMHR-II 1F3 para los estudios *in vitro* e *in vivo*:** Se analizó COV434-AMHR-II 1 F3 mediante citometría de flujo (FACS) usando los anticuerpos de murino
45 anti-AMHR-II (12G4) y anti-HER2 (FRP5), respectivamente. Después de lavar, se añadió un anticuerpo monoclonal conjugado con FITC anti-ratón (Sigma Aldrich) para detectar los anticuerpos primarios. Se usó la incubación directa de las células con el anticuerpo secundario para medidas del fondo. Se analizaron las muestras en un FACScan II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.) observando un mínimo de 20.000 eventos. Se usó la línea celular natural (wt) COV434 como control negativo (Figura 4). Mediante esta técnica, usando QIFIKIT (Dako, Dinamarca), se
50 pudo evaluar una tasa de expresión de aproximadamente 10⁴ receptores de AMHR-II/célula y de 10³ receptores de HER2/célula.

[0178] **Estudios de inmunofluorescencia de la internalización del mAb 12G4 en la línea celular COV434-AMHR-II-1F3 transfectada:** Se visualizó la capacidad de los anticuerpos de internalizarse en las células
55 COV434-AMHR-II-1F3 usando inmunofluorescencia. Para cada ensayo, se cultivaron 5 x 10⁴ células con RPMI en un cubreobjetos de vidrio cuadrado de 22 mm depositado en una placa Petri de 35 mm. Dos días después, durante la fase logarítmica de crecimiento, se incubaron las células con anticuerpos 10 µg/ml (mAb irrelevantes (PX), anti-AMHR-II (12G4), anti-HER2 (FRP5) o sin anticuerpo) en PBS-BSA (1 mg/ml) y se dispusieron a 4°C (condiciones no internalizantes) o se transfirieron a una incubadora a 37°C (condiciones internalizantes). A los 180 minutos, se
60 retiraron los sobrenadantes y se lavaron las células dos veces con PBS-BSA y una vez con PBS. Después de 20 minutos de incubación en formalina (3,7% de p-formaldehído en PBS), se permeabilizaron las células durante 30 segundos en acetona a -20°C. Se diluyó sucesivamente la disolución aumentando el volumen de PBS. Se lavaron las células dos veces con PBS-BSA y se incubaron durante 1 h en la oscuridad con un fragmento F(ab')₂ de Ig de cabra anti-ratón marcado con FITC (Silenus, Eurobio, Francia) en PBS-BSA. Se lavaron entonces tres veces con
65 PBS-BSA y una vez con PBS y se incubaron entonces con 50 µl de diclorhidrato de 4,6-diaminido-2-fenilindol (DAPI, Sigma, Chemical Co.) durante 15 minutos y se prepararon para visualización microscópica fluorescente por

Vectashield®.

- [0179]** Se demostró que los anticuerpos 12G4 anti-AMHR-II y FRP5 anti-HER2 podían internalizarse en células a 37°C, mientras que PX no. Es más, se observan fácilmente vesículas fluorescentes en el citoplasma de células. Por lo tanto, se incubaron también los mAb a 4°C. A esta temperatura baja conocida por inhibir todas las rutas de transporte activo, se observó un marcaje mucho más fuerte de la membrana para ambos anticuerpos específicos, incluso a 4°C. No se encontró ninguno de estos anticuerpos específicos en las células, a pesar de la fuerte asociación de membrana observada.
- 10 **[0180] Efecto antiproliferativo *in vitro* del mAb12G4 (ensayo de MTS):** Se evaluó el efecto de trastuzumab, 12G4, FRP5 o 35A7 sobre la viabilidad celular usando un ensayo de sal de tetrazolio (MTS) y un reactivo de acoplamiento electrónico (PMS). Brevemente, se sembraron células COV434-AMHR-II-1F3 en placas de microvaloración de 96 pocillos a 5.000 células/pocillo en 100 µl de medio. Después de 24 h, se trataron las células con anticuerpos a concentraciones en el intervalo de 0,1 a 1 µg/µl. Después de incubar durante 96 h, se expusieron las células a reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) y se incubaron a 37°C durante 2 h. Se midió la absorbancia a 490 nm y se calculó la inhibición porcentual de la viabilidad como el porcentaje de células proliferantes en comparación con cultivos no tratados. Se efectuaron todos los experimentos por triplicado.
- 15
- 20 **[0181]** Los resultados muestran que puede observarse una inhibición porcentual de la viabilidad de aproximadamente un 20% usando mAb 12G4 o trastuzumab a 1 µg/µg, mientras que a la misma concentración no se observa inhibición con el mAb 35A7 anti-CEA (Figura 5). El trastuzumab se usó como control positivo debido a que su efecto antiproliferativo se ha demostrado extensamente.
- 25 **[0182] Estudio de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* preliminar:** Se efectuaron todos los experimentos *in vivo* cumpliendo con las directrices francesas para estudios con animales experimentales (Acuerdo n° B34-172-27). Se adquirieron ratones sin pelo hembra atímicos de 6-8 semanas de edad en Harlan (Gannat, Francia).
- 30 **[0183]** Se suspendieron células COV434-AMHR-II-1F3 (10×10^6) en 50% de medio de cultivo y 50% de Matrigel (BD Biosciences, Le Pont De Claix, Francia) y se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho de ratones sin pelo atímicos. Se aleatorizaron los ratones portadores de tumor en los diferentes grupos cuando los tumores alcanzaron aproximadamente el mismo volumen. Se trataron los ratones mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.) con NaCl al 0,9% o mAb 12G4. Las cantidades de cada mAb inyectado fueron 200 µg por inyección, dos veces por semana durante cinco semanas consecutivamente.
- 35
- [0184]** Se midieron las dimensiones tumorales semanalmente con un calibre y se calcularon los volúmenes por la fórmula: $D1 \times D2 \times D3 / 2$.
- 40 **[0185]** Se expresaron los resultados mediante una curva de supervivencia de Kaplan-Meier adaptada, usando el tiempo tomado por el tumor para alcanzar el volumen determinado de 1200 mm³ (Figura 6). Se define un retardo medio como el tiempo al que un 50% de los ratones tenían un tumor que había alcanzado el volumen determinado, y se muestra que este retardo medio es 14 días mayor para el grupo tratado en comparación con el grupo de control de NaCl.
- 45
- [0186] Análisis de inmunotransferencia de la expresión de AMHR-II en xenoinjertos:** Se recuperaron células de tumores xenoinjertados y se lisaron con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1% de desoxicolato, 1% de NP40, EDTA 2 mM, 0,1% de SDS y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM). Después de electroforesis en PAGE-SDS al 10% en condiciones reductoras, se transfirieron las proteínas a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (Millipore Co., Bedford, MA) que se saturaron con PBS que contenía un 5% de leche desnatada desecada, y se incubaron entonces con el anticuerpo 12G4 anti-AMHR-II.
- 50
- [0187]** El AMHR-II se expresa fuertemente en tres secciones diferentes del tumor extraído y migra a 65 kDa (Figura 7).
- 55
- REFERENCIAS**
- [0188]** Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Post M, Visser JA, De Rooij DG, Parvinen M, Themmen AP, Grootegoed JA "Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat". Endocrinology, diciembre de 1995; 136(12): 5614-22.
- 60
- Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, Uilenbroek JT, Karels B, Wilming LG, Meijers JH, y col. "A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct". Development, enero de 1994; 120(1): 189-97.
- 65

- Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL. "Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance". Nature, 10 de mayo de 1990; 345(6271): 167-70.
- 5 Belville C, Josso N, Picard JY. "Persistence of Mullerian derivatives in males". Am J Med Genet., 29 de diciembre de 1999; 89(4): 218-23.
- Berek JS, Taylor PT, Gordon A, Cunningham MJ, Finkler N, Orr J Jr, Rivkin S, Schultes BC, Whiteside TL, Nicodemus CF. "Randomized, placebo-controlled study of oregovomab for consolidation of clinical remission in
10 patients with advanced ovarian cancer". J. Clin. Oncol., 1 de septiembre de 2004; 22(17): 3507-16.
- Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. "Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990". Eur. J. Cancer., junio de 1997; 33(7): 1075-107.
- 15 Brady G, Jantzen HM, Bernard HU, Brown R, Schutz G, Hashimoto-Gotoh T. "New cosmid vectors developed for eukaryotic DNA cloning". Gene, febrero de 1984; 27(2): 223-32.
- Caron PC, Laird W, Co MS, Avdalovic NM, Queen C, Scheinberg DA. "Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies", J. Exp. Med., 1 de octubre de 1992; 176(4): 1191-5.
- 20 Chardes T, Villard S, Ferrieres G, Piechaczyk M, Cerutti M, Devauchelle G, Pau B. "Efficient amplification and direct sequencing of mouse variable regions from any immunoglobulin gene family", FEBS Lett., 11 de junio de 1999; 452(3): 386-94.
- 25 Connolly DC, Bao R, Nikitin AY, Stephens KC, Poole TW, Hua X, Harris SS, Vanderhyden BC, Hamilton TC. "Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer", Cancer Res., 15 de marzo de 2003; 63(6): 1389-97.
- di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R. "Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone", Mol. Endocrinol., agosto de 1994; 8(8): 1006-20.
- 30 Dutertre M, Gouedard L, Xavier F, Long WQ, di Clemente N, Picard JY, Rey R. "Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Mullerian hormone in transgenic mice", Endocrinology, septiembre de 2001; 142(9): 4040-6.
- 35 Dutertre M, Rey R, Porteu A, Josso N, Picard JY. "A mouse Sertoli cell line expressing anti-Mullerian hormone and its type II receptor", Mol. Cell. Endocrinol., 31 de diciembre de 1997; 136(1): 57-65.
- 40 Edge AS, Faltynek CR, Hof L, Reichert LE Jr, Weber P. "Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid", Anal Biochem. 15 de noviembre de 1981; 118(1): 131-7.
- Gazzano-Santoro H, Ralph P, Ryskamp TC, Chen AB, Mukku VR. "A nonradioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody", J. Immunol. Methods., 28 de marzo de 1997; 202(2): 163-71.
- 45 Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa S. "A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene", Cell, julio de 1983; 33(3): 717-28.
- Gordon AN, Schultes BC, Gallion H, Edwards R, Whiteside TL, Cermak JM, Nicodemus CF. "CA125- and tumorspecific T-cell responses correlate with prolonged survival in oregovomab-treated recurrent ovarian cancer patients", Gynecol. Oncol., agosto de 2004; 94(2): 340-51.
- 50 Gouedard, L., Chen, Y. G., Thevenet, L., Racine, C., Borie, S., Lamarre, I., Josso, N., Massague, J. y di Clemente, N. (2000), J. Biol. Chem., 275, 27973-27978.
- 55 Hammarstrom, S., Shively, J. E., Paxton, R. J., Beatty, B. G., Larson, A., Ghosh, R., Borner, O., Buchegger, F., Mach, J.-P., Burtin, P., Seguin, P., Darbouret, B., Degorce, F., Sertour, J., Jolu, J.-P., Fuks, A., Kalthoff, H., Schmiegel, W., Arndt, R., Kloppel, G., von Kleist, S., Grunert, F., Schwarz, K., Matsuoka, Y., Kuroki, M., Wagener, C., Weber, T., Yachi, A., Imai, K., Hishikawa, N. y Tsujisaki, M. (1989), Cancer Res., 49, 4852-4858.
- 60 Harwerth, I. M., Wels, W., Marte, B. M. y Hypes, N. E. (1992), J. Biol. Chem., 267, 15160-15167.
- Haskell, C. M., Buchegger, F., Schreyer, M., Carrel, S. y Mach, J.-P. (1983), Cancer Res., 43, 3857-3864.
- 65 Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattei MG, di Clemente N, Tizard R, Carre-Eusebe D, Belville C, Tragethon L, Tonkin C, Nelson J, McAuliffe M, Bidart JM, Lababidi A, Josso N, Cate RL, Picard JY. "Insensitivity to anti-mullerian

- hormone due to a mutation in the human anti-mullerian hormone receptor”, Nat. Genet., diciembre de 1995; 11(4): 382-8.
- Köhler G., M. C. (1975), Nature, 256, 495-497.
- 5 Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, Nagase F, Kurosawa Y. “Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions”, Biochem. Biophys. Res. Commun., 31 de diciembre de 1987; 149(3): 960-8.
- 10 Lee MM, Seah CC, Masiakos PT, Sottas CM, Preffer FI, Donahoe PK, MaLaughlin DT, Hardy MP. “Mullerian inhibiting substance type II receptor expression and function in purified rat Leydig cells”, Endocrinology, junio de 1999; 140(6): 2819-27.
- Masiakos PT, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Teixeira J, Fuller AF Jr, Shah PC, Kehas DJ, Kenneally MK, Dombkowski DM, Ha TU, Preffer FI, Donahoe PK. “Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS”, Clin Cancer Res., noviembre de 1999; 5(11): 3488-99.
- 15 Mason JO, Williams GT, Neuberger MS. “Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence”, Cell, junio de 1985; 41 (2): 479-87.
- Miyaji H, Mizukami T, Hosoi S, Sato S, Fujiyoshi N, Itoh S. “Expression of human beta-interferon in Namalwa KJM-1 which was adapted to serum-free medium”, Cytotechnology, marzo de 1990; 3(2): 133-40.
- 25 Mizukami T, Itoh S. “A new SV40-based vector developed for cDNA expression in animal cells”, J Biochem (Tokyo), mayo de 1987; 101(5): 1307-10.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. “Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, noviembre de 1984; 81 (21): 6851-5.
- 30 Neuberger MS, Williams GT, Fox RO. “Recombinant antibodies possessing novel effector functions”, Nature, 13-19 de diciembre de 1984; 312(5995): 604-8.
- O’Hare K, Benoist C, Breathnach R. “Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, marzo de 1981; 78(3): 1527-31.
- 35 Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder RJ, Xu X, Hamilton TC. “Focus on epithelial ovarian cancer”, Cancer Cell, enero de 2004; 5(1): 19-24.
- 40 Padlan EA. “A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties”, Mol Immunol, abril-mayo de 1991; 28(4-5): 489-98.
- Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferre A, Huhtaniemi I, Josso N, di Clemente N. “Receptors for anti-mullerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 20 de enero de 1998; 95(2): 594-9.
- 45 Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF 3rd, Liotta LA. “Biomarkers of ovarian tumours”, Eur. J. Cancer, noviembre de 2004; 40(17): 2604-12.
- 50 Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G “Reshaping human antibodies for therapy”, Nature, 24 de marzo de 1988; 332 (6162): 323-7.
- Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, Goldmacher VS, Blattler WA, Rees AR, Guild BC. “Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing”, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1 de febrero de 1994; 91(3): 969-73.
- 55 Salhi I, Cambon-Roques S, Lamarre I, Laune D, Molina F, Pugnieri M, Pourquier D, Gutowski M, Picard JY, Xavier F, Pelegrin A, Navarro-Teulon I. “The anti-Mullerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand”, Biochem J., 1 de mayo de 2004; 379(Pt 3): 785-93.
- 60 Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P, Jung M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Maheswaran S. “Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway”, J. Biol. Chem., 15 de septiembre de 2000; 275(37): 28371-9.
- 65 Segev DL, Hoshiya Y, Hoshiya M; Tran TT, Carey JL, Stephen AE, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Maheswaran S.

- "Mullerian-inhibiting substance regulates NF-kappa B signaling in the prostate in vitro and in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8 de enero de 2002; 99(1): 239-44. Epub de 2 de enero de 2002.
- Shitara K, Nakamura K, Tokutake-Tanaka Y, Fukushima M, Hanai N. "A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells" J. Immunol. Methods., 3 de enero de 1994; 167(1-2): 271-8.
- Shopes B. "A genetically engineered human IgG mutant with enhanced cytolytic activity", J Immunol., 1 de mayo de 1992; 148(9): 2918-22.
- 10 Singh-Ranger G, Sharp A, Crinnion JN. "Recurrence of granulosa cell tumour after thirty years with small bowel obstruction", Int. Semin. Surgi Oncol., 11 de mayo de 2004; 1(1):4.
- Strohler R, Kroemer G, Wick G, Kofler R. "Complete variable region sequence of a nonfunctionally rearranged kappa light chain transcribed in the nonsecretor P3-X63-Ag8.653 myeloma cell line", Nucleic Acids Res., 25 de marzo de 15 1987; 15 (6): 2771.
- Studnicka GM, Soares S, Better M, Williams RE, Nadell R, Horwitz AH. "Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues", Protein Eng., junio de 1994; 7(6): 805-14.
- 20 Teixeira J, Donahoe PK. "Molecular biology of MIS and its receptors", J. Androl., julio-agosto de 1996; 17(4): 336-41.
- Thotakura NR, Bahl OP. "Enzymatic deglycosylation of glycoproteins", Methods Enzymol., 1987; 138:350-9.
- 25 Tsuji M, Shima H, Yonemura CY, Brody J, Donahoe PK, Cunha GR. "Effect of human recombinant mullerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during mullerian duct regression in the rat", Endocrinology, septiembre de 1992; 131(3): 1481-8.
- Urlaub G, Chasin LA. "Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, julio de 1980; 77(7): 4216-20.
- 30 van den Berg-Bakker, C. A., Hagemeyer, A., Franken-Postma, E. M., Smit, V. T., Kuppen, P. J., van Ravenswaay Claasen, H. H., Cornelisse, C. J. y Schrier, P. I. (1993), Int. J. Cancer, 53, 613-620.
- 35 Vitetta ES, Fulton RJ, May RD, Till M, Uhr JW. "Redesigning nature's poisons to create anti-tumor reagents", Science, 20 de noviembre de 1987; 238(4830): 1098-104.
- Yahata H, Kobayashi H, Kamura T, Amada S, Hirakawa T, Kohno K, Kuwano M, Nakano H. "Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer", J. Cancer Res. Clin. Oncol., 40 noviembre de 2002; 128(11): 621-6. Epub de 22 de octubre de 2002.
- Yuan QA, Simmons HH, Robinson MK, Russeva M, Marasco WA, Adams GP. "Development of engineered antibodies specific for the Mullerian inhibiting substance type II receptor: a promising candidate for targeted therapy of ovarian cancer", Mol. Cancer Ther., agosto de 2006; 5(8): 2096-105.
- 45 Zhang H, Vollmer M, De Geyter M, Litzistorf Y, Ladewig A, Durrenberger M, Guggenheim R, Miny P, Holzgreve W, De Geyter C. "Characterization of an immortalized human granulosa cell line (COV434)", Mol. Hum. Reprod., febrero de 2000; 6(2): 146-53.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por receptor de tipo II de hormona antimulleriana humana (AMHR-II) que comprende:
 - (a) una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2 para CDR-1, la SEQ ID NO: 3 para CDR-2 y la SEQ ID NO: 4 para CDR-3; y
 - (b) una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 6 para CDR-1, la SEQ ID NO: 7 para CDR-2 y la SEQ ID NO: 8 para CDR-3.
2. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 que comprende:
 - (a) un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 1; y
 - (b) un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 5.
3. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo de murino.
4. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo es obtenible a partir del hibridoma accesible con el número de depósito de la CNCM I-3673.
5. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico de ratón/humano.
6. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
7. Un fragmento de un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, seleccionado del grupo constituido por los fragmentos Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos.
8. Un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un fragmento del mismo según la reivindicación 7.
9. Un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 8.
10. Una célula hospedadora que se ha transformado por un ácido nucleico según la reivindicación 8 y/o un vector según la reivindicación 9.
11. La célula hospedadora según la reivindicación 10, en la que dicha célula es la célula YB2/0 disponible en el número de depósito de la ATCC CRL1662.
12. Un procedimiento de producción de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o de un fragmento del mismo según la reivindicación 7, comprendiendo dicho procedimiento las etapas consistentes en: (i) cultivar una célula hospedadora transformante según la reivindicación 10 u 11 en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo y (ii) recuperar el anticuerpo expresado.
13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o un fragmento del mismo según la reivindicación 7, o un ácido nucleico según la reivindicación 8 y/o un vector según la reivindicación 9 y/o una célula hospedadora según la reivindicación 10 u 11, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un fragmento del mismo según la reivindicación 7, conjugado con un agente anticanceroso.
15. El inmunoconjugado según la reivindicación 14, en el que dicho agente anticanceroso es un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.
16. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un fragmento del mismo según la reivindicación 7, que está marcado con una molécula o sustancia detectable.
17. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el fragmento del mismo según la reivindicación 7, o el inmunoconjugado según la reivindicación 14 o 15, para uso para tratar un cáncer de ovario.
18. Uso *in vitro* de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o de un fragmento del mismo según la reivindicación 7, para el diagnóstico y/o control de un cáncer de ovario.

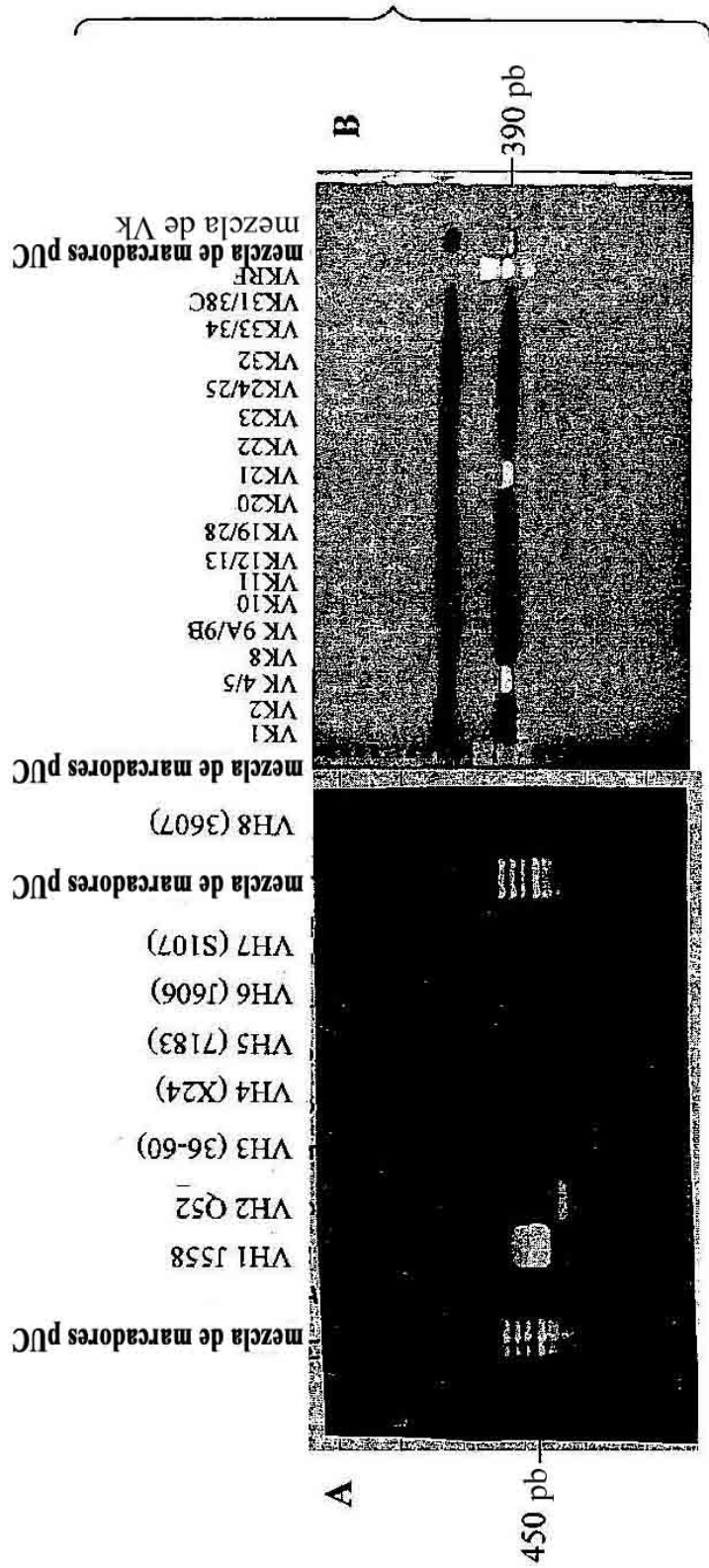
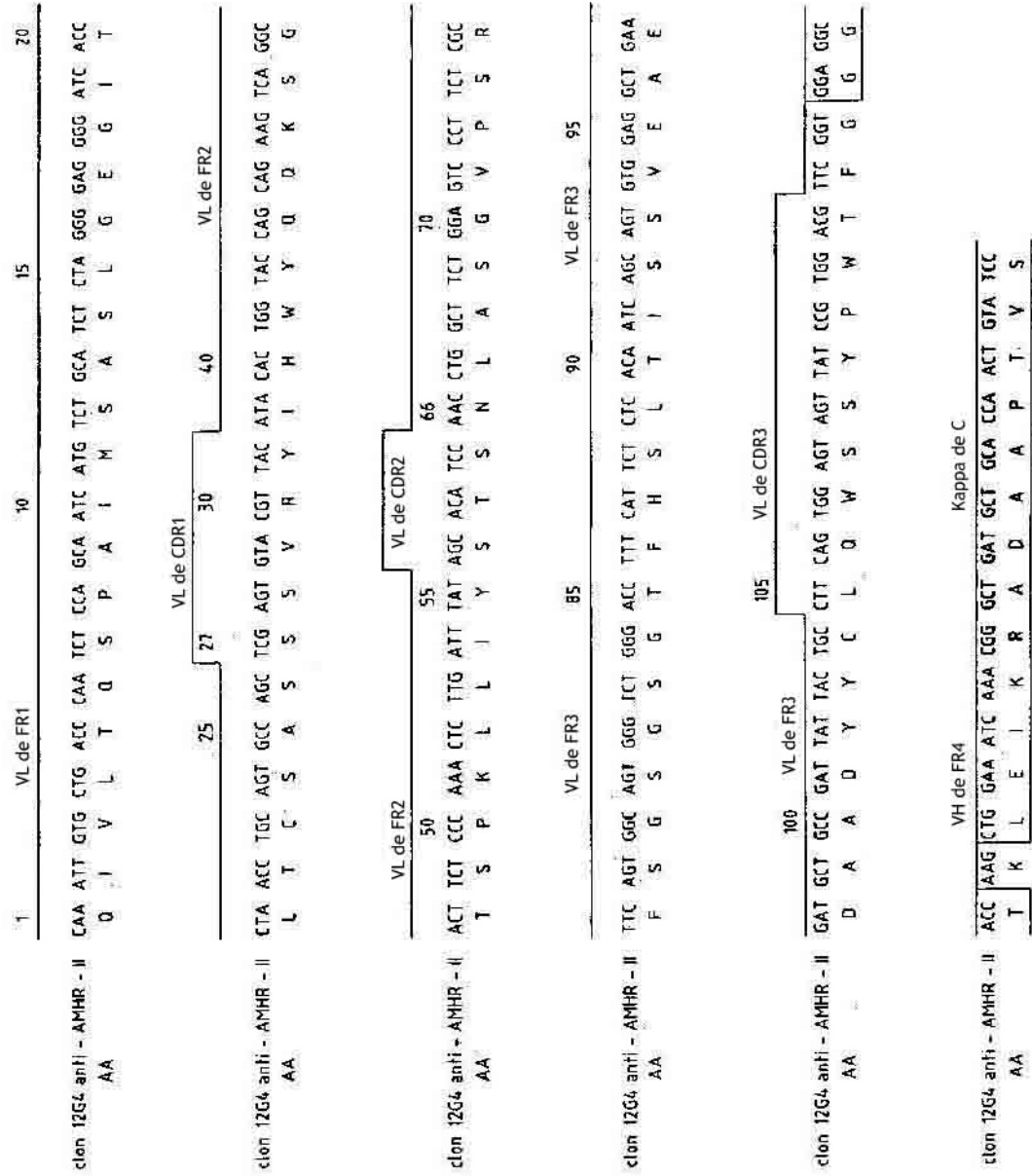


FIG. 1



1 VH de FR1 11 15 20 21

clon 12G4 anti-AMHR-II CAG GTC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAA CTG GTG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AGG ATG TCC TGC AAG
AA Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V R M S C K

VH de CDR1

25 27 30 34 40 VH de FR2 45 VH de FR2 50

clon 12G4 anti-AMHR-II GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACA AGT TAC CAT ATA CAC TGG GTG AAG CAG AAG CCT GGA CAG GGA CTT GAG
AA A S G Y T F T S Y H I H W V K Q R P G Q G L E

VH de CDR2

55 63 70 VH de FR3 75

clon 12G4 anti-AMHR-II TGG ATT GGA TGG ATT TAT CCT GGC GAT GAT TCT ACT AAA TAC AAT GAG AAG TTC AAG GGC AAG ACC ACA
AA W I G W I Y P G D D S T K Y N E K F K G K T T

69 80 VH de FR3 90 95 VH de FR3 100

clon 12G4 anti-AMHR-II CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC M L L S S L T S E D S A
AA L T A D K S S S T A Y
ATG TTG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG

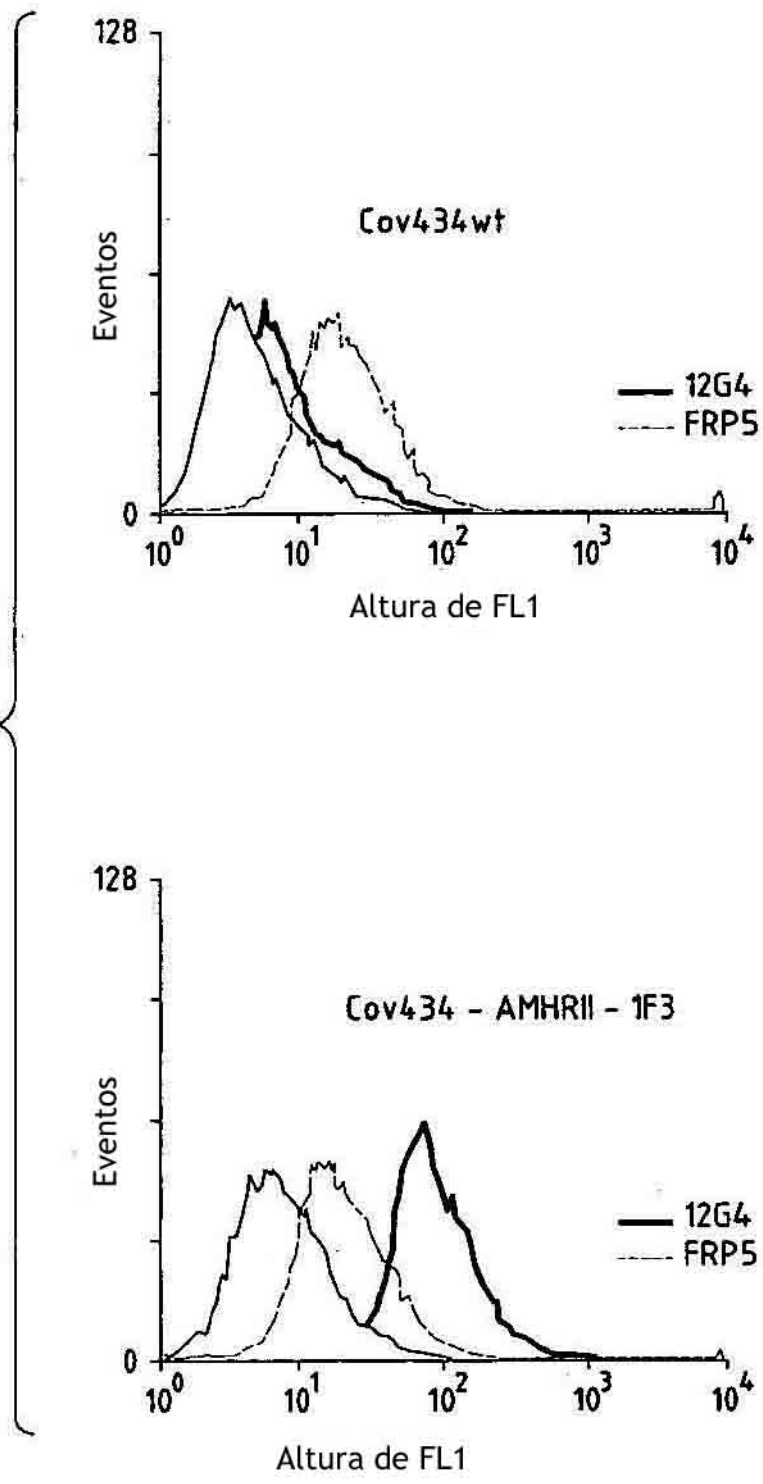
104 105 VH de CDR3 110 115 VH de FR4 120

clon 12G4 anti-AMHR-II ATC TAT TTC TGT ACA AGG GGG GAC CGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA GCC
AA I Y F C T R G D R F A Y W G Q G T L V T V S A
AAA ACG ACA CCC

D-J

FIG.3

FIG.4



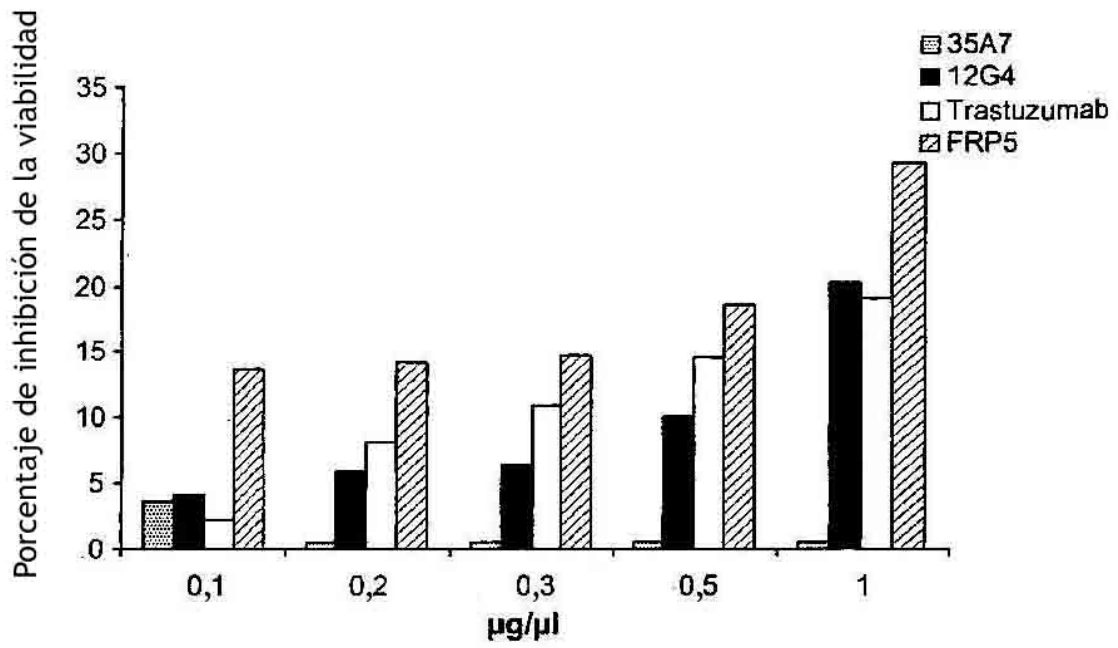


FIG.5

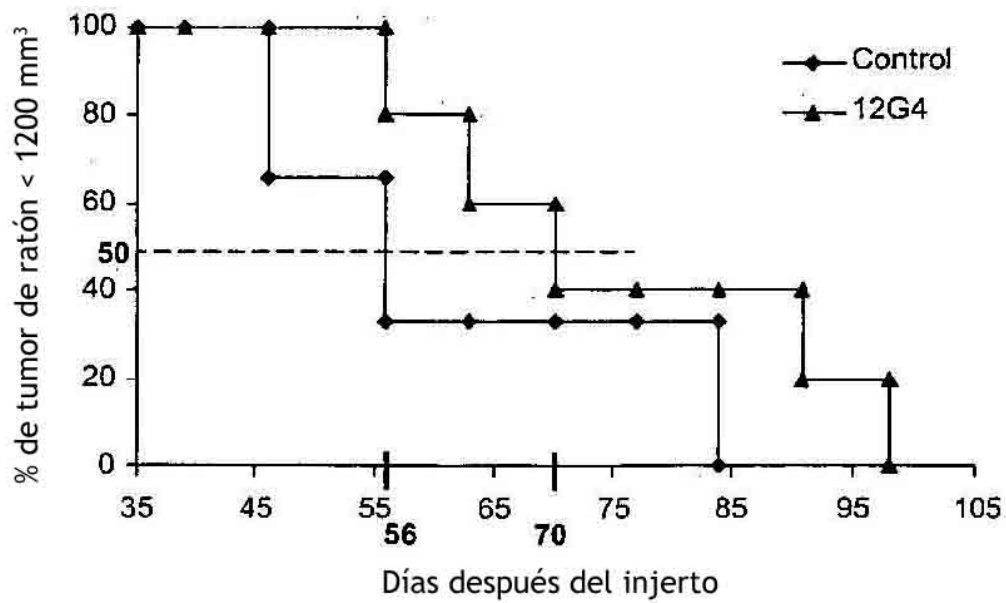


FIG.6

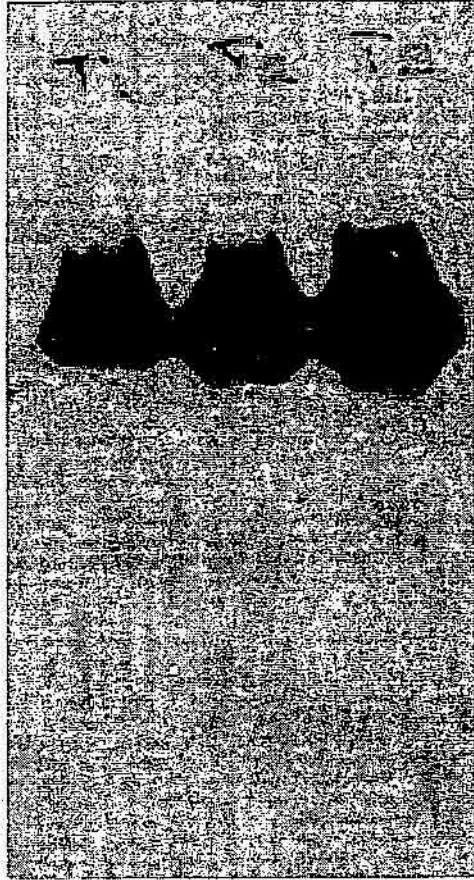


FIG.7