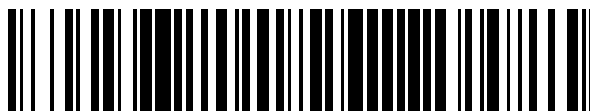


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 167**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008** **E 08759230 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014** **EP 2170956**

54 Título: **Tratamiento de tumores usando anticuerpo anti-L1, específico.**

30 Prioridad:

15.06.2007 US 944359 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2015

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
MEDIGENE AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KELM, DANIELA;
ALTEVOGT, PETER;
MOLDENHAUER, GERHARD;
BREITLING, FRANK;
KRÜGER, ACHIM;
BÄRREITER, SILKE;
LÜTTGAU, SANDRA;
MÖBIUS, ULRICH;
LI, YI;
SEBENS, SUSANNE y
SCHÄFER, HEINER**

74 Agente/Representante:

SERRAT VIÑAS, Sara

ES 2 528 167 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

Tratamiento de tumores usando anticuerpo anti-L1 específico.

El tratamiento convencional de cáncer avanzado a menudo es quimioterapia o radioterapia. Sin embargo, a pesar de la respuesta inicial a la terapia, a menudo se observa que diferentes carcinomas adquieren resistencia a fármacos quimioterápicos o radioterapia lo que conduce a recidiva tumoral y muerte frecuente de los pacientes. A menudo, se decide entonces cambiar a otro fármaco quimioterápico o a dosificaciones mayores. Sin embargo, a menudo no se observa una mejora de la situación clínica.

L1 es una glicoproteína de membrana de tipo I de 200 a 230 kDa que pertenece estructuralmente a la superfamilia de Ig (Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 1988; 334:701-3). L1 desempeña un papel crucial en la orientación de axones y la migración celular en el sistema nervioso en desarrollo (Hortsch M. Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci* 2000; 15:1-10., Schachner M. Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:627-34). Estudios recientes también han implicado la expresión de L1 en la progresión de carcinomas humanos. Se encontró la expresión de L1 en diferentes tumores incluyendo cáncer de pulmón (Katayama M, Iwamatsu A, Masutani H, Furuke K, Takeda K, Wada H, *et al.* Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct Funct* 1997; 22:511-6), gliomas (Senner V, Kismann E, Puttmann S, Hoess N, Baur I, Paulus W. L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration. *Glia* 2002; 38:146-54), melanomas (Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, *et al.* Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 2002; 38:1708-1, Fogel M, Mechttersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu DA, Tilgen W, *et al.* L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* 2003; 189:237-47), carcinoma renal (Meli ML, Carrel F, Waibel R, Amstutz H, Crompton N, Jaussi R, Moch H, Schubiger PA, Novak-Hofer I. Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer*, 1999; 83: 401-408, Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H. The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11:1190-7) y carcinoma de colon (Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, *et al.* L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 2005; 168:633-42). Además, en la técnica se conoce que L1 se sobreexpresa en carcinomas de ovarios y endometriales de una manera dependiente del estadio (Fogel M, Gutwein P, Mechter-sheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, *et al.* L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 2003; 362:869-75).

En la técnica, se ha sugerido el uso de anticuerpos anti-L1 para el tratamiento de tumores de ovarios y endometriales (véanse los documentos WO 02/04952, WO 06/013051 y Arlt MJ, Novak-Hofer I, Gast D, Gschwend V, Moldenhauer G, Grunberg J, *et al.* Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res* 2006; 66:936-43). En la técnica, se conocen diversos anticuerpos anti-L1 (por ejemplo Acm 14.10: Huszar M, Moldenhauer G, Gschwend V, Ben-Arie A, Altevogt P, Fogel M: Expression profile analysis in multiple human tumors identifies L1 (CD171) as a molecular marker for differential diagnosis and targeted therapy. *Hum Pathol* 37:1000-1008, 2006, Acm chCE7: Meli ML, Carrel F, Waibel R, Amstutz H, Crompton N, Jaussi R, Moch H, Schubiger PA, Novak-Hofer I: Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer* 83:401-408, 1999, Acm UJ 127.11: Patel K, Kiely F, Phimister E, Melino G, Rathjen F, Kemshead JT: The 200/220 kDa antigen recognized by monoclonal antibody (MAb) UJ127.11 on neural tissues and tumors is the human L1 adhesion molecule. *Hybridoma* 10:481-491, 1991, Acm 5G3: Wolff JM, Frank R, Mujoo K, Spiro RC, Reisfeld RA, Rathjen FG: A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 263:11943-11947, 1988). Además, en Sebens Muerkoster *et al.*, *Oncogene*. 26 de abril de 2007; 26(19):2759-68, Epub 6 de noviembre de 2006, se ha sugerido el uso de anticuerpos anti-L1 para sensibilizar células tumorales para el tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia.

Siempre existe una necesidad de agentes anti-tumorales mejorados.

La presente invención se refiere en un aspecto a un anticuerpo monoclonal anti-L1

i) que puede unirse al mismo epítipo de L1 reconocido por el anticuerpo monoclonal 9.3, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841 y que se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} , o

ii) caracterizado porque sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) tienen las siguientes secuencias: LCDR1: RASQDISNILN, LCDR2: YTSRLHS, LCDR3: QQGNTLPWT, HCDR1: RYWML, HCDR2: EINPRNDRNTYNEKFKT y HCDR3: GGGYAMDY, y que se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} , o

iii) un anticuerpo monoclonal, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841.

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que el anticuerpo monoclonal 9.3, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841, tiene capacidades anti-tumorales mejoradas (véanse los ejemplos). Especialmente, el anticuerpo monoclonal 9.3 tiene la mejor capacidad para inhibir el crecimiento tumoral y la invasión de células tumorales de todos los anticuerpos sometidos a prueba. Además, el anticuerpo monoclonal 9.3 parece suprimir la quimiorresistencia en un mayor grado que el anticuerpo 11A sometido a prueba en el documento WO 2008/046529 (véase el ejemplo 13).

Los anticuerpos monoclonales y la producción de anticuerpos monoclonales pertenecen al estado de la técnica y también se describen en las referencias citadas en la sección de materiales y métodos de los ejemplos. En general, los anticuerpos monoclonales puede prepararse, por ejemplo, según el método conocido de Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) *Nature*, 349, 293-299). Como alternativa a la preparación de hibridomas secretores de anticuerpo monoclonal, puede identificarse y aislarse un anticuerpo monoclonal dirigido contra un polipéptido de la invención mediante el examen de una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación en fago de anticuerpo) con el polipéptido de interés. Kits para generar y examinar bibliotecas de presentación en fago están disponibles comercialmente (por ejemplo, el sistema de anticuerpo en fago recombinante de Pharmacia, n.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación en fago SurfZAP de Stratagene, n.º de catálogo 240612). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de métodos y reactivos particularmente convenientes para su uso en la generación y el examen de una biblioteca de presentación de anticuerpo, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.223.409; los documentos WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; Fuchs *et al.*, 1991, *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.*, 1992, *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.*, 1989, *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.*, 1993, *EMBO J.* 12:725-734.

Dado que el efecto de un anticuerpo está mediado por su capacidad para unirse a un epítipo específico, la invención se refiere a todos los anticuerpos monoclonales que reconocen el mismo epítipo que el anticuerpo 9.3 y que se unen a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} . En la técnica se conocen métodos para determinar el epítipo de un anticuerpo dado e incluyen la preparación de péptidos lineales sintéticos de una región de interés dada y las pruebas posteriores de si el anticuerpo se une a dichos péptidos (véase Epitope Mapping, A practical approach, Oxford University Press 2001, Editores: Olwyn Westwood y Frank Hay). Alternativamente, pueden producirse diferentes proteínas recombinantes que cubre la región de interés y someterse a prueba para determinar la unión del anticuerpo (Oleszewski, M., Gutwein, P., von der Liet, W., Rauch, U., Altevogt, P. Characterization of the L1-neurocan binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. *J. Biol. Chem.* 275: 34478-34485 (2000).

Además, una vez que se conoce un epítipo específico de un anticuerpo monoclonal, se encuentra dentro del conocimiento del experto en la técnica identificar o preparar otros anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales, o moléculas de unión tal como se definen a continuación que se unen al mismo epítipo. Por ejemplo, es posible usar los péptidos o las proteínas descritos anteriormente en el contexto del mapeo de epítopos también para la identificación o producción de dichos anticuerpos o moléculas de unión.

Tal como puede deducirse a partir de los ejemplos, el epítipo del anticuerpo 9.3 está con el primer dominio similar a inmunoglobulina de L1. Por tanto el epítipo del anticuerpo monoclonal de la invención también está preferiblemente dentro del primer dominio similar a inmunoglobulina de L1.

Además, se da a conocer un anticuerpo monoclonal anti-L1, que tiene la misma capacidad para inhibir el crecimiento tumoral que el anticuerpo monoclonal 9.3, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841. Esta capacidad puede someterse a prueba usando el mismo ensayo de crecimiento tumoral descrito en el ejemplo 1, sección 1.3.9. Según la invención, "la misma capacidad" significa que el anticuerpo monoclonal tiene una capacidad de inhibición del crecimiento tumoral que no difiere en más del 5% de la capacidad de inhibición del crecimiento tumoral del anticuerpo monoclonal 9.3.

Preferiblemente, este anticuerpo de la invención también inhibe la dimerización de L1, tal como se ha mostrado para el anticuerpo 5G3 (véase anteriormente).

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-L1, caracterizado porque sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) tienen las siguientes secuencias LCDR1: RASQDISNILN, LCDR2: YTSRLHS, LCDR3: QQGNTLPWT, HCDR1: RYWML, HCDR2: EINPRNDRTNYNEKFKT, HCDR3: GGGYAMDY, y que se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} .

Las secuencias mencionadas anteriormente muestran las CDR del anticuerpo monoclonal 9.3 determinadas según el método de Kabat (véase el ejemplo 2). Un anticuerpo monoclonal de la invención de este tipo puede producirse, por ejemplo, mediante injerto de CDR o mediante producción recombinante del anticuerpo. En la técnica se conocen tales métodos (véase por ejemplo Queen, patente estadounidense n.º 5.585.089 y Winter, documento U.S. 5.225.539, Cabilly documento U.S. 4.816.567).

Se da a conocer un anticuerpo monoclonal anti-L1, caracterizado porque al menos una de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR)

a) tiene una de las siguientes secuencias QDISNY, YTS, QQGNTLPWT, GYTFTRYW, INPRNDRT o ALGGGYAMDY o

- 5 b) tiene una secuencia que, en comparación con las secuencias mencionadas en a) tiene al menos un intercambio de aminoácidos conservativo.

Estas secuencias muestran de nuevo las CDR del anticuerpo monoclonal 9.3 (véase la figura 12), pero las CDR se han determinado usando otro método conocido en la técnica, concretamente según el método IMGT® del sistema de información internacional ImMunoGeneTics®.

En un aspecto especialmente preferido, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841. Esta célula de hibridoma se depositó en la Colección alemana de microorganismos y células el 25 de abril de 2007 según el tratado de Budapest.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado que comprende las CDR no humanas de un anticuerpo monoclonal de la invención y una región de entramado (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana.

20 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región de entramado (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véanse, por ejemplo, Queen, patente estadounidense n.º 5.585.089 y Winter, documento U.S. 5.225.539). Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica.

25 En general, con el fin de obtener un anticuerpo humanizado, pueden alterarse secuencias de ácido nucleico que codifican para cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables humanas reemplazando las secuencias de CDR de la secuencia humana (aceptora) por la secuencia que codifica para la CDR respectiva en la secuencia de anticuerpo de ratón (secuencia donadora). La secuencia aceptora humana puede comprender FR derivada de diferentes genes.

Posteriormente pueden obtenerse secuencias que codifican para anticuerpos de longitud completa uniendo las secuencias de cadena pesada variable y ligera variable modificadas con regiones de cadena pesada constantes y de cadena ligera constantes humanas. Las secuencias de cadena ligera constantes humanas preferidas incluyen secuencias de cadena ligera constantes kappa y lambda. Las secuencias de cadena pesada constantes humanas preferidas incluyen IgG1, IgG2 y secuencias que codifican para mutantes de IgG1 que tienen propiedades inmunoestimulantes modificadas. Tales mutantes pueden tener una capacidad reducida para activar citotoxicidad celular dependiente de complemento y/o de anticuerpo y se describen en los documentos US 5.624.821; WO 99/58572, US 6.737.056. Una cadena pesada constante especialmente preferidas es una IgG1 que comprende las sustituciones E233P, L234V, L235A, A327G, A330S, P331S y a delección de residuo 236.

En otra realización, el anticuerpo de longitud completa comprende una secuencia de IgA, IgD, IgE, IgM, IgY o IgW.

45 Pueden determinarse secuencias donadoras humanas adecuadas mediante comparación de secuencias de las secuencias de péptido codificadas por las secuencias donadoras de ratón con un grupo de secuencias humanas, preferiblemente con secuencias codificadas por genes de anticuerpo maduro o genes de inmunoglobulina de línea germinal humanos. Una secuencia humana con una alta homología de secuencia, preferiblemente con la homología más alta determinada, puede servir como la secuencia aceptora para el procedimiento de humanización.

50 Además del intercambio de CDR de ratón por CDR humanas, pueden llevarse a cabo manipulaciones adicionales en la secuencia donadora humana para obtener una secuencia que codifica para un anticuerpo humanizado con propiedades optimizadas (tal como afinidad del antígeno).

55 En un ejemplo preferido, los residuos 31-35, 50-58 y 95-102 y residuos 6, 23, 24, y 49 de cadena pesada en la secuencia aceptora humana se alteran para que se correspondan con los residuos respectivos de la secuencia de ratón (Adair, documento U.S. 5.859.205).

Además las secuencias de dominio variable de anticuerpo aceptoras humanas también pueden modificarse para que codifiquen para uno o más aminoácidos (según el sistema de numeración de Kabat) de posición 4, 35, 38, 43, 44, 46, 58, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 85, 98 de la región variable ligera y 2, 4, 36, 39, 43, 45, 69, 70, 74, 75, 76, 78, 92 de la región variable pesada que se corresponden con la secuencia donadora de ratón (Carter y Presta, documento U.S. 6.407.213).

La humanización de un anticuerpo contra L1 de ratón se describe en el ejemplo 2.

Se da a conocer que las secuencias de las CDR pueden alterarse, preferiblemente mediante intercambios que

conducen a un intercambio de aminoácidos conservativo.

En general, las manipulaciones pueden dar como resultado alteraciones en la FR así como las regiones CDR e incluyen intercambios, deleciones e inserción de residuos. Las alteraciones pueden inducirse por mutagénesis al azar o dirigida. Puede emplearse un sistema de presentación en fago de anticuerpo, tal como se describió anteriormente, para la selección de mutantes con propiedades deseadas y/o mejoradas.

Se da a conocer un anticuerpo humano que puede reconocer el mismo epítipo que el anticuerpo 9.3. En la técnica se conocen métodos para generar anticuerpos humanos. Estos métodos emplean por ejemplo ratones en los que los genes de inmunoglobulinas endógenos se han inactivado parcial o completamente y se han introducido loci de inmunoglobulinas humanas. Tras la inmunización con un epítipo inmunogénico, estos ratones pueden producir anticuerpos humanos (documentos U.S. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.589.369; 5.591.669; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016).

En una realización adicionalmente preferida, el anticuerpo humanizado de la invención comprende la secuencia de L1_9.3hu o L1_9.3hu3 tal como se muestra en la figura 8a) y b).

Se da a conocer una molécula de unión que comprende

a) al menos una de las siguientes secuencias RASQDISNILN, YTSRLHS, QQGNTLPWT, RYWML, EINPRNDRTNYNEKFKT o GGGYAMDY o

b) al menos una secuencia que tiene, en comparación con las secuencias facilitadas en a), al menos un intercambio de aminoácidos conservativo.

Tal como se explicó anteriormente, estas secuencias muestran las CDR del anticuerpo 9.3 (véase el ejemplo 2).

Se da a conocer una molécula de unión que comprende

a) al menos una de las siguientes secuencias QDISNY, YTS, QQGNTLPWT, GYTFTRYW, INPRNDRT o ALGGGYAMDY o

b) al menos una secuencia que tiene, en comparación con las secuencias facilitadas en a), al menos un intercambio de aminoácidos conservativo.

Tal como se explicó anteriormente, estas secuencias muestran de nuevo las CDR del anticuerpo monoclonal 9.3, determinadas mediante otro método conocido en la técnica.

Tal molécula de unión es una molécula que puede unirse a L1. Preferiblemente, la molécula de unión es una molécula que comprende inmunoglobulina, es decir comprende al menos un dominio de Ig.

Se da a conocer que la molécula de unión de la invención se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo scFv, multímeros de diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos similares a scFv, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo Fab), TandAbs, Flexibodies, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos quiméricos).

En la técnica se conoce la estructura de un anticuerpo y especialmente la función de sus CDR (Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. Nature Rev. Immunol. 6:343-357, 2006).

scFv y multímeros de los mismos, TandAbs, diacuerpos y Flexibodies son formatos de anticuerpo convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo a partir de los documentos WO 88/1649, WO 93/11161, WO 99/57150 y EP1293514B1.

En Fv de cadena sencilla (scFv) las dos regiones variables de unión a antígeno de la cadena ligera y pesada (VH Fv y VL Fv) de un anticuerpo están conectadas artificialmente por un péptido de unión, designado como fragmento variable de cadena sencilla o anticuerpo de cadena sencilla (Bird, *et al.* (1988) Science 242:423-426; Orlandi, *et al.* (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:3833-3837; Clarkson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991)). El sitio de unión a antígeno está compuesto por los dominios variables de cadenas ligera y pesada de un anticuerpo monoclonal. Varias investigaciones han mostrado que el fragmento Fv tiene de hecho la afinidad de unión a antígeno intrínseca completa de un sitio de unión del anticuerpo completo.

En el contexto de esta invención, diacuerpos son scFv con dos especificidades de unión y pueden ser o bien monoespecíficos y bivalentes o bien biespecíficos y bivalentes.

TandAbs y Flexibodies son formatos de anticuerpo adicionales que se definen, por ejemplo, en los documentos US2007031436 y EP1293514, respectivamente.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos de la proteína mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen el, pero no se limitan al, fragmento F(ab')₂ que puede producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; el fragmento de Fab' que puede generarse reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')₂; el fragmento Fab que puede generarse tratando el anticuerpo molecular con papaína y un agente reductor; y fragmentos Fv.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que se derivan partes diferentes de especies animales diferentes, tales como aquéllas que tienen una región variable derivada de un Acm murino y una región constante de inmunoglobulina humana. (Véanse, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.567; y Boss *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.397).

Los anticuerpos bifuncionales, o biespecíficos, tienen sitios de unión a antígeno de especificidades diferentes. Se han producido diversas formas de anticuerpos biespecíficos. Éstas incluyen BSIGG, que son moléculas de IgG que comprenden dos cadenas pesadas distintas y dos cadenas ligeras distintas que se secretan por los denominados "hibridomas híbridos" y conjugados de heteroanticuerpo producidos por la conjugación química de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de especificidades diferentes (Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. Bispecific antibodies in cancer therapy. *Current Opin. Immunol.* 11:558-562, 1999, Van Spriel AB, Van Ojik HH, Van de Winkel JGJ. Immunotherapeutic perspective for biespecific antibodies. *Immunology Today* 21:391-397, 2000).

Se han generado anticuerpos biespecíficos para suministrar células, citotoxinas o fármacos a sitios específicos. Un uso importante ha sido suministrar células citotóxicas huésped, tales como células T citotóxicas o citolíticas naturales, a dianas celulares específicas. (P. J. Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315 (1990)). Otro uso importante ha sido suministrar proteínas citotóxicas a dianas celulares específicas. (V. Raso, T. Griffin, *Cancer Res.* 41:2073 (1981); S. Honda, Y. Ichimori, S. Iwasa, *Cytotechnology* 4:59 (1990)). Otro uso importante ha sido suministrar fármacos no proteicos anticancerosos a dianas celulares específicas (J. Corvalan, W. Smith, V. Gore, *Intl. J. Cancer Sup.* 2:22 (1988); M. Pimm *et al.*, *British J. of Cancer* 61:508 (1990)). Tales anticuerpos biespecíficos se han preparado mediante reticulación química (M. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)), intercambio de disulfuro o la producción de hibridomas híbridos (cuadromas). Los cuadromas se construyen fusionando hibridomas que secretan dos tipos diferentes de anticuerpos contra dos antígenos diferentes (Kurokawa, T. *et al.*, *Biotechnology* 7,1163 (1989)).

En una realización preferida de la invención, el anticuerpo de la invención está unido a una sustancia activa, preferiblemente una toxina, una nanopartícula, una citocina o un radionúclido. En la técnica se conocen tales conjugados de anticuerpo (Wu AM, Senter PD. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature Biotechnol.* 23:1137-1146, 2005, Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. *Annu. Rev. Med.* 58:221-237, 2007, documentos WO 90/12592, WO 2007/030642, WO 2004/067038, WO 2004/003183, US 2005/0074426, WO 94/04189).

El anticuerpo de la invención se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} ó 10^{-11} .

Preferiblemente, el anticuerpo de la invención no se une significativamente a otros miembros de la familia de proteínas de L1 tales como por ejemplo CHL1 (homólogo cercano de L1, número de registro NM_006614), NrCAM (proteína de adhesión a células neuronales, número de registro NM_001037132 o NM_005010) y/o NFASC (neurofascina, número de registro NM015090). Preferiblemente el anticuerpo se une a los otros miembros de la familia de L1 con una afinidad al menos 100 veces menor, más preferiblemente una afinidad al menos 1000 veces menor en comparación con la afinidad por L1. La afinidad del anticuerpo por las diferentes proteínas puede determinarse por ejemplo midiendo la afinidad de unión a proteínas recombinantes tal como se describe en el ejemplo 6. La unión del anticuerpo a los diferentes miembros de la familia de L1 de la familia de L1 también puede determinarse expresando dichas proteínas en células CHO y midiendo la unión del anticuerpo mediante análisis de FACS tal como se describe en el ejemplo 1.2 y el ejemplo 7.

Un aspecto de la invención es que el anticuerpo no aumenta significativamente la liberación de citocinas, por ejemplo factor de necrosis tumoral-alfa o interferón gamma. Preferiblemente la liberación no se aumenta en más del 30%, más preferiblemente no más del 20% y lo más preferiblemente no más del 10%. La liberación de citocinas puede someterse a prueba tal como se describe en el ejemplo 8. Alternativamente la concentración de citocinas puede determinarse en la sangre de un animal antes y después de la administración del anticuerpo. La concentración de citocinas puede determinarse mediante un ensayo ELISA u otros métodos conocidos en la técnica.

En otra realización preferida el anticuerpo no induce significativamente la proliferación de células T ni inhibe la proliferación de células T. El efecto de un anticuerpo sobre la proliferación de células T puede determinarse tal como se describe en el ejemplo 9.

Se da a conocer una molécula de unión que puede unirse al mismo epítipo de L1 reconocido por el anticuerpo monoclonal 9.3, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841. Con respecto a esta molécula de unión dada a conocer, también se aplican a esta molécula de unión las mismas realizaciones definidas

con respecto a la estructura de la molécula de unión descrita anteriormente.

Preferiblemente, la unión del anticuerpo al epítipo no se aumenta ni disminuye significativamente por el estado de glicosilación de la proteína L1. La influencia del estado de glicosilación sobre la unión del anticuerpo puede determinarse tal como se describe en el ejemplo 10.

Además, la invención se refiere a una célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la invención.

Además, la invención se refiere a la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841.

Tal como se explicó anteriormente y tal como se describe en la sección de ejemplos, el anticuerpo monoclonal de la invención es especialmente adecuado para el tratamiento de enfermedades tumorígenicas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad tumorígenica.

Además, la invención también se refiere al anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar una enfermedad tumorígenica, en el que un anticuerpo de la invención se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad. Con respecto a dicho uso de la invención, también se aplican todas las realizaciones tal como se definen a continuación para el uso de la invención.

Tal como se mencionó anteriormente, en la técnica se ha sugerido el uso de anticuerpos anti-L1 para sensibilizar células tumorales para el tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia (véase Sebens Mürkoster *et al.*, *Oncogene*. 26 de abril de 2007; 26(19):2759-68, Epub 6 de noviembre de 2006). Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención se refiere al anticuerpo de la invención para su uso en un método para sensibilizar células tumorales en un paciente para el tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia.

Este aspecto de la presente invención es especialmente útil en casos en los que las células tumorales son al menos parcialmente resistentes a quimioterapia o a radioterapia.

Por tanto, en una realización preferida de la invención, las células que van a sensibilizarse son al menos parcialmente resistentes al tratamiento con dicho fármaco quimioterápico o a radioterapia.

En el contexto de la presente invención, el término “sensibilizar” debe entenderse como que tras el tratamiento con el anticuerpo anti-L1 de la invención, las células tumorales son más sensibles al tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia que antes de dicho tratamiento. Esto puede someterse a prueba por ejemplo aislando células tumorales del paciente y someténdolas a prueba *in vitro* para observar si el tratamiento con dicho anticuerpo o molécula de unión de la invención da como resultado una sensibilización de las células. Esta prueba puede realizarse tal como se describe en la referencia (Sebens Mürkoster *et al.*, *Oncogene*. 26 de abril de 2007; 26(19):2759-68, Epub 6 de noviembre de 2006).

En una realización preferida, las células, antes de la administración del anticuerpo anti-L1 de la invención, no eran sensibles al tratamiento o sólo eran sensibles hasta un grado en que el tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia no daba como resultado el efecto terapéutico deseado.

Preferiblemente, con la ayuda del anticuerpo anti-L1 de la invención, se aumenta la sensibilidad en al menos el 20%, más preferiblemente en al menos el 40% e incluso más preferiblemente en al menos el 100%.

En Remington's Pharmaceutical Sciences, 5ª ed., capítulo 33, en particular las páginas 624 a 652, por ejemplo, se facilita un resumen de fármacos quimioterápicos y radioterapia.

Puede usarse cualquiera de los numerosos fármacos quimioterápicos en los usos de la invención. Estos compuestos se encuentran dentro de diversas categorías diferentes, incluyendo, por ejemplo, agentes alquilantes, antibióticos antineoplásicos, antimetabolitos y derivados de una fuente natural.

Los ejemplos de agentes alquilantes que pueden usarse en la invención incluyen busulfano, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida (es decir, Cytosan), dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, procarbazona, estreptozocina y tiotepa.

Los ejemplos de antibióticos antineoplásicos incluyen bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitomicina (por ejemplo, mitomicina C), mitoxantrona, pentostatina y plicamicina.

Los ejemplos de antimetabolitos incluyen fluorodesoxiuridina, cladribina, citarabina, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5FU)), gemcitabina, hidroxiaurea, mercaptopurina, metotrexato y tioguanina.

Los ejemplos de derivados de una fuente natural incluyen docetaxel, etopósido, irinotecán, taxanos (por ejemplo paclitaxel), tenipósido, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, prednisona y tamoxifeno.

Ejemplos adicionales de agentes quimioterápicos que pueden usarse en la invención incluyen asparaginasa y mitotano.

Además, también puede usarse ceramida C2.

En una realización especialmente preferida, el fármaco quimioterápico se selecciona del grupo que consiste en actinomicina D, mitomicina C, cisplatino, doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina, 5-FU, taxanos tales como paclitaxel y carboplatino.

Según la invención, el término “radioterapia” se refiere a cada terapia con radiación que se usa comúnmente para tratar células tumorales. En una realización preferida, esta terapia incluye rayos γ , rayos X, microondas, radiación UV así como la administración directa de radioisótopos a o cerca de células tumorales (braquiterapia).

Tal como se mencionó anteriormente, el objetivo de este aspecto de la invención es sensibilizar células tumorales para el tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia. Por consiguiente, en una realización preferida, tras la sensibilización con el anticuerpo anti-L1 de la invención, al paciente se le trata adicionalmente con dicho fármaco quimioterápico o con dicha radioterapia.

En el contexto de la presente invención, se prevé sensibilizar células tumorales de cualquier tipo celular o tratar cualquier enfermedad tumorigénica. Preferiblemente, las células tumorales o la enfermedad tumorigénica son de un tipo seleccionado del grupo que consiste en astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma, meduloblastoma, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer endometrial, cáncer renal, neuroblastomas, carcinomas de células escamosas, meduloblastomas, hepatoma, colon cáncer y mesotelioma y carcinoma epidermoide.

Además, se prefiere que las células tumorales sean de un tumor epitelial o la enfermedad tumorigénica sea un tumor epitelial, preferiblemente en el que el tumor epitelial es cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovarios o cáncer endometrial.

En una realización preferida el anticuerpo no induce efectos secundarios neuronales cuando se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Tal como se mencionó anteriormente, el anticuerpo anti-L1 se usa para la preparación de una composición farmacéutica.

En general, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto terapéutico y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o mencionado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida de manera general para su uso en animales, y más particularmente, en seres humanos. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, incluyendo, pero sin limitarse a, aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. Solución salina y disolución acuosa de dextrosa son portadores preferidos cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Preferiblemente se emplean soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como supositorio, con aglutinantes tradicionales y portadores tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” de E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del producto terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe ser adecuada para el modo de administración.

En una realización preferida, la composición se formula, según procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, composiciones para la

administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran o bien por separado o bien mezclados junto en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua o solución salina estéril para inyección de manera que los componentes pueden mezclarse antes de la administración.

Los productos terapéuticos de la invención pueden formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como aquellas derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., aquellas formadas con grupos amina libre tales como aquellas derivados de isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc., y aquellas derivados de hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio y férricos, etc.

La cantidad del producto terapéutico de la invención, que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o estado particular, dependerá de la naturaleza del trastorno o estado, y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o el trastorno, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, intervalos de dosificación adecuados para la administración intravenosa son de manera general de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Intervalos de dosificación adecuados para la administración intranasal son de manera general de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba en modelos *in vitro* o animales. En general, los supositorios pueden contener el principio activo en el intervalo del 0,5% al 10% en peso; las formulaciones orales contienen preferiblemente del 10% al 95% de principio activo.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar un producto terapéutico de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas y microcápsulas: uso de células recombinantes que pueden expresar el producto terapéutico, uso de endocitosis mediada por receptor (por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432); construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión, mediante inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal, etc.), y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente de aerosolización.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente a la zona que necesita el tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas tras la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un tumor maligno o tejido neoplásico o preneoplásico.

En otra realización, el producto terapéutico puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990, Science 249:1527-1533), más particular un liposoma catiónico (documento WO 98/40052).

En aún otra realización, el producto terapéutico puede administrarse mediante un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (Langer, citado anteriormente). En aún otra realización, un sistema de liberación controlada puede colocarse cerca de la terapéutica, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica.

También se da a conocer un método para sensibilizar células tumorales en un paciente para el tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-L1 o molécula de unión de la invención. Todas las realizaciones descritas anteriormente también se aplican a este método.

A lo largo de toda la invención, el término "cantidad eficaz" significa que una molécula o compuesto dados se

administran en una cantidad suficiente para obtener un efecto terapéutico deseado. En el caso en el que, a lo largo de toda la invención, se administran dos compuestos en una cantidad eficaz terapéutica, esto incluye que uno o cada uno de los compuestos se administra en una cantidad inferior a la terapéutica, es decir que la cantidad de cada compuesto por sí misma no es suficiente para proporcionar un efecto terapéutico, pero que la combinación de los compuestos da como resultado el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, también se incluye dentro de la presente invención que cada uno de los compuestos por sí mismo se administre en una cantidad terapéuticamente eficaz.

También se da a conocer el uso del anticuerpo anti-L1 o molécula de unión de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de células tumorales en un paciente tratado anteriormente con un fármaco quimioterápico o con radioterapia.

Tal como se mencionó anteriormente, el tratamiento de células tumorales con anticuerpos anti-L1 ya se ha descrito en los documentos WO 02/04952 y WO 06/013051.

En el contexto de la presente invención, el término “tratado anteriormente” puede incluir pacientes que ya se han tratado con un fármaco quimioterápico o con radioterapia en el transcurso de un régimen separado que ha tenido lugar por ejemplo en el plazo de los últimos seis u ocho meses.

En el transcurso de tratamiento anti-tumoral con fármacos quimioterápicos o radioterapia en la mayoría de los casos se observa que tras una respuesta inicial del tumor a tal terapia (reducción de la masa tumoral o estabilización de la enfermedad) los tumores comienzan a progresar de nuevo. Habitualmente, tal progresión comienza semanas o meses tras tal terapia. Normalmente estos tumores son entonces resistentes a tratamiento adicional con el fármaco quimioterápico aplicado anteriormente y se desean otras modalidades de tratamiento. Tal como se describió anteriormente se ha encontrado que tales tumores resistentes expresan L1 y por tanto se convierten en una diana para anticuerpos anti-L1.

Por tanto, según esta realización de la invención, el término “tratado anteriormente” significa preferiblemente que el paciente recibió anteriormente tal tratamiento, tal tratamiento mostró un efecto inicial y, en el momento de terapia con el anticuerpo anti-L1 o la molécula de unión, el tumor está progresando de nuevo.

Además, el término “tratado anteriormente” también puede observarse en un contexto en el que el anticuerpo anti-L1 contra L1 o la molécula de unión y el fármaco quimioterápico o la radioterapia se usan dentro del mismo régimen, lo que significa que los tratamientos se administran dentro de un calendario de tratamiento. En este contexto “en un calendario de tratamiento” significa que los tratamientos se aplican al mismo tiempo, uno tras otro o de manera intermitente, pero, al contrario que lo anterior, las distancias en el tiempo entre los tratamientos individuales son cortas (en el plazo de una semana o en el plazo de 2-4 días) y, si se observa éxito en un tratamiento, no se espera a la progresión tumoral antes de aplicarse el siguiente tratamiento.

Preferiblemente, en este contexto, la invención incluye el caso en el que se trata a un paciente con un fármaco quimioterápico o con radioterapia y posteriormente, de manera preferible en el plazo de una semana o menos y más preferiblemente en el plazo de 2-4 días, se comienza un tratamiento con el anticuerpo anti-L1 de la invención. En una realización adicionalmente preferida se llevan a cabo varios ciclos de quimioterapia o radioterapia por un lado y tratamiento con el anticuerpo anti-L1, con intervalos preferiblemente de una semana o menos y más preferiblemente en el plazo de 2-4 días.

En una realización preferida, el paciente es al menos parcialmente resistente al tratamiento con dicho fármaco quimioterápico o con radioterapia, un efecto observado a menudo en el transcurso de dichos tipos de tratamiento (véase anteriormente).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo anti-L1 de la invención para su uso en el tratamiento de células tumorales en un paciente al menos parcialmente resistente a tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia dados.

En el contexto de la presente invención, el término “resistente a tratamiento” significa que la célula tumoral respectiva no reacciona al tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia de manera completa. En vez de eso, con respecto a estas células tumorales, el tratamiento con dicho fármaco quimioterápico o radioterapia es más bien ineficaz o incluso no muestra efectos.

En un aspecto adicional de la invención, la invención se refiere a un anticuerpo anti-L1 de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad tumorigénica, en el que el anticuerpo anti-L1 se administra en combinación con un fármaco quimioterápico o con radioterapia, preferiblemente en el que el fármaco quimioterápico o la radioterapia se administran antes que el anticuerpo anti-L1 de la invención.

Según la invención, el término “tratamiento de enfermedad tumorigénica” incluye tanto la destrucción de células tumorales, la reducción de la proliferación de células tumorales (por ejemplo en al menos el 30%, al menos el 50% o

al menos el 90%) así como la inhibición completa de la proliferación de células tumorales. Además, este término incluye la prevención de una enfermedad tumorigénica, por ejemplo destruyendo células que pueden o son propensas a convertirse en células tumorales en el futuro así como la formación de metástasis.

Según la invención, el término “en combinación con” incluye cualquier administración combinada del anticuerpo anti-L1 y el fármaco quimioterápico o la radioterapia. Esto puede incluir la aplicación simultánea de los fármacos o la radioterapia o, preferiblemente, una administración separada. En el caso en el que se prevé una administración separada, preferiblemente se garantizará que no transcurrirá un periodo de tiempo significativo entre el momento de administración, de manera que el anticuerpo anti-L1 y el fármaco quimioterápico o la radioterapia todavía podrán ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. En tales casos, se prefiere que se ponga en contacto la célula con ambos agentes en el plazo de aproximadamente una semana, preferiblemente en el plazo de aproximadamente 4 días, más preferiblemente en el plazo de aproximadamente 12-36 horas entre sí.

El fundamento tras este aspecto de la invención es que la administración de fármacos quimioterápicos o el tratamiento con radioterapia conduce a un aumento de la expresión de L1 sobre la superficie de las células tumorales que a su vez hace que las células tumorales sean una mejor diana para el anticuerpo anti-L1.

Por tanto, este aspecto de la invención también abarca regímenes de tratamiento en los que se administra un anticuerpo anti-L1 en combinación con el fármaco quimioterápico o la radioterapia en diversos ciclos de tratamiento en los que cada ciclo puede estar separado por un periodo de tiempo sin tratamiento que puede durar, por ejemplo, dos semanas y en los que cada ciclo puede implicar la administración repetida del anticuerpo anti-L1 y/o el fármaco quimioterápico o la radioterapia. Por ejemplo tal ciclo de tratamiento puede abarcar el tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia, seguido por ejemplo por aplicar dos veces el anticuerpo anti-L1 en el plazo 2 días.

A lo largo de toda la invención, el experto entenderá que la terapia individual que va a aplicarse dependerá por ejemplo de las condiciones físicas del paciente o de la gravedad de la enfermedad y por tanto tendrá que ajustarse en cada caso.

Especialmente en el transcurso de tales ciclos de tratamiento repetidos, también se prevé dentro de la presente invención que el anticuerpo anti-L1 se administre antes que el fármaco quimioterápico o la radioterapia.

También se da a conocer un método para tratar células tumorales en un paciente tratado anteriormente con un fármaco quimioterápico o con radioterapia, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-L1 de la invención. Además, también se da a conocer un método para tratar células tumorales en un paciente al menos parcialmente resistente a tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia dados, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-L1 de la invención. Además, se da a conocer un método para tratar células tumorales en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-L1 de la invención en combinación con un fármaco quimioterápico o con radioterapia. Además, se da a conocer un método para tratar células tumorales en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-L1 de la invención.

El anticuerpo de la invención también puede usarse en un método para un método de diagnóstico para determinar el nivel de la proteína L1 en líquidos o tejido corporales.

Con respecto a estos métodos de la invención, se da a conocer que también se aplican todas las realizaciones descritas anteriormente para los otros usos o métodos de la invención.

La invención también se refiere al anticuerpo de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad tumorigénica o para la sensibilización de células tumorales en un paciente para el tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia.

En una realización preferida, dicho uso presenta además las características definidas para los usos de la invención.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo de la invención. Con respecto a dicha composición farmacéutica, también se aplican todas las realizaciones descritas anteriormente.

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Leyendas para las figuras y las tablas

Figura 1

(A) Análisis de FACS de células CHO, CHO-L1, SKOV3ip y OVMz. Se tiñeron las células con los Acm indicados (10 µg/ml) durante 30 min a 4°C. Seguido por un Acm conjugado con PE secundario. (B) Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se transfirieron lisados celulares de células CHO wt, CHO-L1, OVMz y

SKOV3ip sobre una membrana de PVDF y entonces se incubaron con el Acm frente a L1 indicado (1 µg/ml), seguido por un Acm secundario conjugado con POX.

Figura 2

(A) Efecto de anticuerpos sobre la fosforilación de Erk en células SKOV3ip. Se incubaron las células durante 24 h a 37°C con los anticuerpos frente a L1 purificados indicados (10 µg/ml) o IgG1 de control de isotipo. También se trataron las células con DMSO (vehículo), o el inhibidor específico de MEK, PD59098. Se examinaron los lisados celulares para determinar la fosforilación de Erk.

(B) Efecto de anticuerpos sobre la fosforilación de Erk en células SKOV3ip. Tinción fluorescente de células tratadas con anticuerpo con un anticuerpo específico de fosfo-Erk y un Acm secundario conjugado con Alexa488.

Figura 3

Análisis de invasión celular de Matrigel. Se sembraron células SKOV3ip tratadas con anticuerpo (10 µg/ml) en una placa de 4 pocillos y se dejó que invadieran el Matrigel durante 20 h (CO₂ al 5%; 37°C).

Figura 4

Expresión génica diferencial en células SKOV3ip. (A) Se transfectaron células SKOV3ip con ARNip específico de L1 o desorganizado y 72 h después se aislaron ARNm, se transcribieron para dar ADNc y se usaron como molde para qPCR (análisis de SYBRgreen). (B) Se trataron células SKOV3ip con el Acm L1-9.3 (10 µg/ml) o el Acm de control, IgG1 (10 µg/ml) y 96 h después se aislaron ARNm, se transcribieron para dar ADNc y se analizaron mediante qPCR para determinar la expresión de los genes indicados (análisis de SYBRgreen). (C) Expresión génica diferencial de células tumorales residuales. Se aislaron ARNm de tumores residuales a partir de animales tratados con anticuerpo, se transcribieron para dar ADNc y se analizaron mediante qPCR para determinar la expresión de los genes indicados.

Figura 5

Crecimiento tumoral en ratones desnudos. Se inyectaron i.p. células SKOV3ip marcadas con *LacZ* en ratones desnudos y tras la implantación tumoral se trató a los animales con los Acm contra L1 indicados o Acm control, EpCAM (Hea125). Tras 30 días se determinó el volumen tumoral y se facilita como la razón entre masa tumoral teñida con X-Gal y los sitios totales. Se analizaron 6 animales por grupo.

Figura 6

(A) Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de constructos L1-V5. Se recibieron sobrenadantes de células de insecto Sf9 transfectadas de Ricardo Gouveia y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando Acm L1-9.3 y volvieron a analizarse con sonda mediante Acm anti-V5. (B) Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de constructos L1-FC. Se transfectaron constructos L1-FC en células Cos-7 usando reactivo de transfección Jet PEI™ tal como se describe. Tras 3 días se purificaron los sobrenadantes usando SepharoseA y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando Acm L1-9.3.

Figura 7

Ensayo de adhesión homófila de células. (A) Se analizó la unión de células J558-L1 mediante microscopía de campo brillante. En este caso se muestra un ejemplo de cada tratamiento. En el cuadro rojo se destaca el recubrimiento con L1-Fc (10 µg/ml) y en el cuadro negro se muestran ambos controles, fibronectina (10 µg/ml) y BSA. (B) El gráfico muestra la media ± DE de células unidas tras el tratamiento con anticuerpo o control indicado.

Figura 8

En las figuras 8a y 8b, respectivamente, se proporcionan las secuencias de ADN de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo usadas para construir los anticuerpos humanizados.

Figura 9

Secuencias de aminoácidos del scFv murino de L1_9.3 (a) y de los scFv humanizados de L1_9.3Hu (b) y L1_9.3Hu3 (c).

Figura 10

Secuencias de ADN y de aminoácidos de las partes expresadas de constructos de scFv de L1_9.3 (a), L1-9.3Hu (b)

y L1_9.3Hu3 (c).

Figura 11

5 Unión de los scFv de L1_9.3, L1-9.3Hu y L1_9.3Hu3 al antígeno de cáncer L1 humano. Las filas A, B y C están recubiertas con L1 y las filas D, E y F están recubiertas con estreptavidina. El color azul en los pocillos indica unión del scFv individual al L1 en la placa. La ausencia de color en las filas recubiertas con estreptavidina muestra que los anticuerpos de cadena sencilla se unen específicamente a L1.

10 Figura 12

Secuencias genómicas de los dominios variables del anticuerpo monoclonal 9.3.

15 a) Secuencia de la región variable de cadena kappa (líneas de puntos: CDR1, líneas discontinuas: CDR2, subrayado: CDR3).

b) Secuencia de la región variable de cadena pesada (líneas de puntos: CDR1, líneas discontinuas: CDR2, subrayado: CDR3).

20 Figura 13

A) Se incubaron CMSP y células tumorales OVMZ positivas para L1 humanas con Acm L1-9.3 durante 24 h y se determinó la cantidad de anticuerpo unido mediante análisis de FACS.

25 B) Se estimaron las constantes de disociación K_D a partir de las curvas de regresión usando la concentración a la mitad de la unión máxima.

Figura 14

30 L1-9.3 no tiene ningún efecto sobre la liberación de citocinas por CMSP humanas en reposo y activadas. Se determinaron los niveles de citocinas de CMSP en reposo y activadas por OKT3 a partir de tres donantes diferentes tras una incubación durante 24 h en presencia o ausencia de L1-9.3 20 $\mu\text{g/ml}$. Se usaron ionomicina/PMA y LPS como controles de estimulación. Se muestran los resultados para IFN- γ (A) y TNF- α (B).

35 Figura 15

40 L1-9.3 no induce la proliferación de células T y no tiene ningún efecto sobre la proliferación de células T inducida por OKT3. Se determinó la proliferación de CMSP activadas por OKT3 a partir de dos donantes diferentes en presencia o ausencia de L1-9.3 20 $\mu\text{g/ml}$ usando un ensayo de incorporación de BrdU 48 h tras la estimulación. No hubo diferencia en si el anticuerpo se añadió antes de, en paralelo con o tras la estimulación con OKT3 75 ng/ml. L1-9.3 por sí mismo no dio como resultado la activación de células T.

Figura 16

45 L1-9.3 no se vio afectado por la desglicosilación de L1. Se muestra la tinción de inmunotransferencia de tipo Western de L1 en lisado celular no tratado y desglicosilado usando varios Acm anti-L1 diferentes. Los anticuerpos sometidos a prueba pueden dividirse en tres clases con respecto a su dependencia de la glicosilación: primera clase (no afectada por la glicosilación): L1-9.3. Segunda clase (la unión en WB se vio afectada de manera negativa por la desglicosilación): 11A, 14.10, OV52.24 y OV549.20. Tercera clase (la unión en WB se vio afectada de manera positiva por la desglicosilación): 35.9 y 38.12.

Figura 17

55 La figura muestra la unión *in vivo* de L1-9.3 aplicado por vía intravenosa a túbulo colectores del riñón. La unión *in vivo* sólo fue detectable usando el sistema de amplificación de CSA (figura 17A), mientras que usando el método de ABC convencional no podía verse ninguna señal (figura 17B). Por tanto, se detectó L1-9.3 en un intervalo de 30-300 pmol en el tejido (se supone que la concentración de L1-9.3 es superior a 5 ng/ml e inferior a 50 ng/ml). El control negativo no mostró tinción, por tanto, puede descartarse la tinción no específica (figura 17C). El patrón de tinción del L1-9.3 unido *in vivo* (figura 17A) corresponde al patrón de expresión de L1 en el riñón cuando se tiñen directamente secciones de tejido con L1-9.3 (figura 17D).

Figura 18

Análisis de FACS de Acm L1-9.3 humanizados

65 Análisis de citometría de flujo de células SKOV3ip con pcDNA3.1-luciferasa. Se tiñeron las células con los Acm

humanizados indicados (10 µg/ml) durante 30 min, 4°C, seguido por un Acm conjugado con PE secundario.

Figura 19

5 *Modelo de xenoinjerto de SKOV3ip de ratón*

Se inyectaron por vía intraperitoneal 7×10^6 células SKOV3ip con pcDNA3.1-luciferasa en ratones CD1 nu/nu hembra de 6 semanas de edad. Tras 24 h se aleatorizaron los ratones en grupos de 10 ratones. A cada grupo de ratones se le inyectó por vía intraperitoneal tres veces por semana 300 µg de o bien Acm L1-chi9.3, o bien Acm L1-hu3 o bien PBS.

En el día 33 se obtuvieron imágenes de ratones (figura 2). Se determinó el volumen tumoral usando el sistema XENOGEN IVIS 200. En resumen, se anestesió a los ratones y se les inyectaron por vía intraperitoneal 100 µl de luciferina D (3 µg/ratón). Tras esto, se midió la actividad luciferasa de las células tumorales detectando la emisión de luz. El volumen tumoral se muestra como fotones por segundo (flujo total). Se realizó el análisis estadístico usando la prueba de la t de Student.

Figura 20

20 *Masa tumoral total in vivo*

Tras 36 días se sacrificaron los ratones y se determinó la masa tumoral. El crecimiento tumoral se facilita como una razón de la masa tumoral con respecto al peso corporal. (A ratones individuales, B valor medio). Se realizó el análisis estadístico usando la prueba de la t de Student. Por tanto, el tratamiento de ratones inmunodeficientes con anticuerpo L1-9.3 pudo reproducirse con formas quimerizadas y humanizadas del Am L1-9.3.

Figura 21

Las células PT45-P1res o bien se dejaron sin tratar (sin) o bien se trataron con gemcitabina (A) o etopósido (B) 20 µg/ml en ausencia (sin) o presencia de o bien anticuerpo 9.3 anti-L1CAM 1 ó 10 µg/ml o bien anticuerpo de control de isotipo coincidente 1 ó 10 µg/ml. Tras 24 horas, se analizaron las células mediante ensayo de caspasa-3/-7. Se muestran las medias ± DE de tres experimentos independientes. * indica $p < 0,05$.

Figura 22

Las células Colo357 o bien se dejaron sin tratar (sin) o bien se trataron con gemcitabina (A) o etopósido (B) 20 µg/ml en ausencia (sin) o presencia de o bien anticuerpo 9.3 anti-L1CAM 1 ó 10 µg/ml o bien anticuerpo de control de isotipo coincidente 1 ó 10 µg/ml. Tras 24 horas, se analizaron las células mediante ensayo de caspasa-3/-7. Se muestran las medias ± DE de tres experimentos independientes. * indica $p < 0,05$.

Tabla 1

La tabla muestra un resumen de anticuerpos sometidos a prueba en los ensayos indicados.

45 **Ejemplos**

1. Ejemplo 1

1.1 Resumen del ejemplo 1

La molécula de adhesión L1 (L1-CAM) es una molécula de adhesión celular transmembrana implicada en la migración celular y orientación de axones en el sistema nervioso en desarrollo. L1 también se sobreexpresa en carcinomas de ovarios y endometriales. En este caso la expresión de L1 está asociada con un mal pronóstico. En líneas celulares de carcinoma, la sobreexpresión de L1 aumenta la motilidad celular, el crecimiento tumoral en ratones e induce la expresión de genes dependientes de Erk. En este caso, se muestra que el tratamiento con anticuerpos frente a L1 suprime la activación de Erk, bloquea la invasión de células a Matrigel y disminuye el crecimiento tumoral en ratones desnudos. En células tratadas con anticuerpos contra L1 la inducción de genes dependientes de Erk tales como HOX A9, $\beta 3$ -integrina e IER 3 se invierte *in vitro* e *in vivo*. En este informe, se demuestra que el anticuerpo L1-9.3 es el mejor anticuerpo terapéutico de todos los anticuerpos contra L1 sometidos a prueba. En todos los casos L1-9.3 mostró los mejores resultados referentes al fenotipo invasivo o al efecto terapéutico sobre el crecimiento tumoral. Pudo mostrarse que L1-9.3 se une al primer dominio similar a Ig de L1 y puede bloquear la unión homófila L1-L1. El bloqueo de la unión homófila sólo se observó con L1-9.3. Se concluye que L1-9.3 es superior en la terapia ya que combina dos funciones: bloquea la activación de erk e interfiere con la función de unión de L1.

1.2 Resultados del ejemplo 1

1.2.1 Análisis de FACS de los nuevos anticuerpos contra L1

5 Usando inmunización con una proteína de fusión L1-Fc recombinante, se generaron anticuerpos contra L1
novedosos L1-9.3, L1-14.10, L1-35.9 y L1-38.12. Para esclarecer la especificidad por L1 se sometieron a prueba los
nuevos Acm contra L1 estos anticuerpos en las líneas celulares de carcinoma de ovarios que expresan L1 endógena
OVMz y SKOV3ip y las células de ovario de hámster chino CHO y se transdujeron de manera estable células CHO-
L1 mediante tinción fluorescente (figura 1A) y análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 1B).
10 Todos los anticuerpos sometidos a prueba mostraron una tinción positiva de L1 en células CHO-L1 (figura 1A). El
patrón de tinción para las células OVMz y SKOV3ip fue diferente para los anticuerpos. De manera interesante, el
anticuerpo L1-9.3 mostró una tinción brillante de ambas líneas celulares de carcinoma de ovarios OVMz y SKOV3ip,
mientras que L1-14.10 mostró una tinción muy débil (figura 1A). Ninguno de los dos anticuerpos contra L1, L1-35.9 y
L1-38.12, pudo unirse a la L1 endógena de estas células (figura 1A). Tal como se esperaba, no pudo observarse
15 ninguna tinción para L1 en células CHO que se usaron como control negativo. Todos los nuevos anticuerpos
detectaron L1 de longitud completa en lisados de células CHO-L1, OVMz y SKOV3ip mediante análisis mediante
inmunotransferencia de tipo Western. Las células CHO negativas para L1 sirvieron de nuevo como control negativo.

1.2.2 La fosforilación de Erk disminuye tras el tratamiento con anticuerpos

20 Un informe reciente ha mostrado que la expresión de L1 en colaboración con factores de crecimiento derivados de
suero condujo a una activación de Erk sostenida y la inducción de genes dependientes de Erk (Silletti *et al*, 2004).
Se investigó si el efecto supresor de anticuerpos contra L1 podía deberse a interferencia con la regulación génica
mediada por L1. Por tanto, se examinó el modo de acción de anticuerpos contra L1 usando células SKOV3ip. Los
25 Acm L1-11A, L1-9.3 y L1-14.10 bloquearon eficazmente la fosforilación de Erk (figura 2A) *in vitro*. No hubo ninguna
inhibición con Acm de control de isotipo coincidente, DMSO como vehículo o el anticuerpo contra L1, L1-38.12
(figura 2A) que sólo puede unirse a la isoforma neuronal de L1. El análisis fluorescente con el anticuerpo contra Erk
específico de fosfo confirmó una clara reducción de Erk activado. También pudo observarse un agotamiento a partir
del núcleo en células tratadas con Acm contra L1 (L1-11A, L1-9.3 y L1-14.10) (figura 2B).

1.2.3 El tratamiento con anticuerpos contra L1 redujo la invasión de células

Anteriormente se demostró que el tratamiento con un anticuerpo frente a L1 (L1-11A) redujo la migración celular
haptotáctica sobre fibronectina y la invasión de Matrigel de diferentes líneas celulares (Arlt *et al*, 2006). Se comparó
35 la capacidad de invasión de células SKOV3ip tratadas con los diferentes anticuerpos contra L1. Los anticuerpos L1-
11A, L1-14.10 y especialmente L1-9.3 redujeron la invasión de SKOV3ip (figura 3). En marcado contraste, las
células tratadas con los anticuerpos L1-35.9 o L1-38.12 no mostraron una reducción de la invasión (figura 3).

1.2.4 Los anticuerpos frente a L1 afectan a la expresión génica *in vitro* e *in vivo*

40 Se examinó adicionalmente si los anticuerpos frente a L1 afectaban al perfil de expresión génica en células SKOV3ip
in vitro de una manera similar a la observada para el agotamiento mediado por ARNip de L1 (figura 4A). De hecho,
el análisis mediante qRT-PCR de células tratadas con L1-9.3 o L1-11A frente a anticuerpo de control mostró
cambios significativos en la expresión de genes regulados por L1 tales como β 3-integrina, los factores de
45 transcripción HOXA9 y los genes relacionados con la apoptosis IER 3 y STK 39 (figura 4A). El mismo conjunto de
genes se reguló por disminución en células SKOV3ip transducidas con un ARNip específico de L1 (figura 4B).

Se sometió a prueba si el Acm L1-9.3 también podía influir sobre el perfil de expresión génica de células SKOV3ip *in vivo*
de manera similar a lo observado *in vitro*. Para ello, se aislaron ARNm de tumores residuales de ratones
50 tratados con L1-9.3 o ratones tratados con control de IgG y se sometieron a análisis mediante qRT-PCR. El
tratamiento con L1-9.3 condujo a una regulación significativa de genes dependientes de L1 tal como se demuestra
para HOXA9, β 3-integrina e IER 3 (figura 4C).

1.2.5 Análisis de la tumorigenicidad en ratones desnudos

55 A continuación, se investigó si el crecimiento intraperitoneal de SKOV3ip en ratones podía inhibirse mediante
tratamiento con los Acm L1-11A, L1-9.3 o L1-14.10. Se inyectaron células SKOV3ip-lacZ en la cavidad peritoneal de
ratones desnudos hembra 2 días antes del comienzo de la terapia. De manera bisemanal se realizaron tratamientos
i.p. usando la concentración de anticuerpo de 10 mg/kg. Se trataron ratones control con PBS o HEA125 (anticuerpo
60 anti-EpCAM) como anticuerpo de control (10 mg/kg i.p. de manera bisemanal). En todos los grupos de tratamiento
con Acm anti-L1, pudo observarse una disminución sustancial en la cantidad de masa tumoral en comparación con
PBS o el anticuerpo de control HEA-125 (figura 5). En comparación con el control, todos los Acm anti-L1 condujeron
a una reducción dependiente de la dosis de la carga tumoral i.p. [L1-11A (10 mg/kg), -40%; L1-14.10 (10 mg/kg),
-30%; L1-9.3 (10 mg/kg), -60%; figura 5]. La reducción del tumor en el grupo tratado con L1-9.3 (10 mg/kg) fue
65 estadísticamente significativa ($P_{L1-9.3 (10 \text{ mg/kg})} = 0,004$) en comparación con el control de PBS. Los ratones tratados
con el anticuerpo de control HEA125 no revelaron ninguna reducción detectable de carga tumoral i.p. de SKOV3ip-

lacZ en comparación con el grupo tratado con PBS (figura 5), aunque EpCAM está presente en las células SKOV3ip y HEA125 puede unirse a las células tumorales. No se observaron efectos secundarios ni toxicidad grave del tratamiento con Acm contra L1, L1-11A, L1-9.3 o L1-14.10, durante todo el transcurso del tratamiento.

- 5 Por tanto, el tratamiento con anticuerpos frente a L1 redujo el crecimiento tumoral de células SKOV3ip (figura 5) lo que sugiere que los anticuerpos frente a L1 pueden regular la expresión génica pero también afectar *in vivo* al crecimiento tumoral.

1.2.6 Estudio de Biacore de los nuevos anticuerpos contra L1

- 10 Este estudio lo realizó Avidex (Oxford) tal como se describe en el ejemplo 6. La tabla I resume estos resultados referentes a la cinética de unión de los nuevos anticuerpos contra L1 (ka, kd y KD).

1.2.7 Mapeo de epítomos del sitio de unión de L1-9.3

- 15 Un factor importante para la caracterización de anticuerpos contra L1 novedosos es examinar sus sitios de unión en L1. Por tanto, se construyó una variedad de proteínas de fusión L1-Fc que cubrían diferentes partes de la molécula. Se amplificaron los productos de PCR que codificaban para diferentes longitudes de regiones de ectodominio de L1. Se clonaron estos constructos en el vector pIg, y se expresaron como proteínas de fusión de Fc. Tras la purificación, se usaron los productos para el análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western. Para comparar los resultados, se analizaron otros fragmentos de proteína L1 recombinante (obtenidos de Ricardo Gouveia, Oeiras, Portugal). Se encontró que L1-9.3 se unía al primer dominio de Ig de L1 (figura 6). L1-14.10 se une al tercer dominio de Ig mientras que L1-11A se une entre el sitio FN3-5 (figura 6).

25 1.2.8 m4B L1-9.3 bloquea la unión homófila L1-L1

- Se planteó la cuestión de si los anticuerpos contra L1 podían interferir con la función de unión homófila de L1. Para tratar esta cuestión, se usó un ensayo de adhesión celular en el que se dejó que células transfectadas con L1 se unieran a L1 inmovilizada. Tras un recubrimiento inicial de portaobjetos de vidrio con una proteína de fusión L1-Fc recombinante, fibronectina para control positivo (a la que se unen las células de una manera dependiente de integrina) o BSA como control negativo, se incubaron células J558-L1 con anticuerpo L1-11A, L1-9.3 o L1-14.10. Para el control, se usó un control de IgG, PBS o un anticuerpo frente a CD24 (SWA11). El Acm L1-9.3 podía bloquear completamente la unión homófila L1-L1, mientras que ninguno de los demás anticuerpos sometidos a prueba pudo interferir con la capacidad de unión homófila. Ninguno de los anticuerpos interfirió con la unión a fibronectina (datos no mostrados).

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Líneas celulares y cultivo celular

- 40 Se hicieron crecer las líneas celulares de carcinoma de ovarios humanas SKOV3ip (amablemente proporcionada por Ellen Vitetta, University of Texas, Dallas, TX) y OVMz en DMEM (Biocrom, Berlín, Alemania) con FCS al 10% en condiciones de cultivo celular (CO₂ al 5%, humedad relativa al 95%, 37°C). Para la identificación y cuantificación de la masa tumoral, se transdujeron las células SKOV3ip de manera estable con un vector retroviral que codificaba para *lacZ* (sistema retroviral GeneSuppressor, Biocarta, Hamburgo, Alemania). Se estableció la línea celular de ovario de hámster chino CHO que expresa de manera estable L1 humana (hL1) mediante transfección con Superfect (Stratagene, Heidelberg, Alemania) y selección para determinar la expresión de L1 con Acm L1-11A y perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) o clasificación con un instrumento FACS Calibur. Se cultivaron todas las células en DMEM complementado con FCS al 10% a 37°C, CO₂ al 5% y humedad del 100%. Se obtuvieron plásmidos que codificaban para L1 humana y células J558-L1 del Dr. Vance Lemmon (University of Miami, Miami, FL, EE.UU.).

1.3.2 Anticuerpos

- 55 HEA-125, una IgG1 de ratón dirigida contra EpCAM, se describió anteriormente y se une a todos los adenocarcinomas humanos (Moldenhauer *et al.*, 1987). Se obtuvieron los anticuerpos monoclonales L1-14.10 (Huszar *et al.*, 2006), L1-9.3, L1-35.9 y L1-38.12 tras la inmunización de ratones con proteína L1 humana-Fc que comprende el ectodominio de L1 (Oleszewski *et al.*, 1999). Se purificó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón por afinidad y se absorbió en proteínas séricas humanas (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA).

1.3.3 Análisis bioquímico

- 65 SDS-PAGE y transferencia de proteínas separadas a membranas Immobilon usando transferencia semiseca se describieron anteriormente (Gutwein *et al.*, 2000). Tras el bloqueo con leche desnatada al 5% en TBS o BSA al 1% en TBS/Tween-20 al 0,1%, se revelaron las transferencias con el anticuerpo primario respectivo seguido por anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y detección por ECL.

1.3.4 Análisis de FACS

La tinción de superficie de células con cantidades saturantes de Acm, o bien sobrenadantes de hibridoma o bien anticuerpos purificados, y anticuerpos de cabra conjugados con PE frente a Ig de ratón (Dianova, Hamburgo, Alemania) se ha descrito en otra parte (Ebeling *et al.*, 1996). Se analizaron las células teñidas con un instrumento FACScan (Becton Dickinson).

1.3.5 Inmunofluorescencia

Para la tinción inmunofluorescente, se hicieron crecer células sobre cubreobjetos, se trataron durante 10 min con pervanadato y se fijaron durante 20 min con paraformaldehído al 4%/PBS a temperatura ambiente. Se lavaron las células en PBS y se permeabilizaron con NP-40 al 0,1% en PBS que contenía suero de cabra al 5% durante 15 min a temperatura ambiente. Entonces se incubaron las células durante 1 hora con el primer anticuerpo (contra Erk1/2 específico de fosfo). Tras 3 etapas de lavado con PBS se incubaron las células durante 30 min en la oscuridad con un segundo anticuerpo de cabra conjugado con Alexa488 anti-IgG de ratón. Tras lavar las células dos veces con PBS, se montaron las células teñidas sobre portaobjetos de vidrio y se examinaron con un microscopio de epifluorescencia (Axioplan-2; Zeiss, Oberkochen).

1.3.6 Ensayo de invasión

Se determinó la invasión de células tumorales *in vitro* en un ensayo de doble filtro tal como se describió anteriormente en Erkell *et al.* (1988). En resumen, se colocó una capa de Matrigel entre dos filtros, un filtro inferior de nitrocelulosa con poros de 5 µm y un filtro superior de policarbonato con poros de 8 µm. Tras la incubación de 10⁵ células con la estructura intercalada de filtros durante 20 h en 1 ml de medio, se fijó la estructura intercalada y se separaron los filtros y se tiñeron con DAPI. Se contaron las células presentes en el gel en el filtro inferior, y se expresó la invasión celular como la razón del número de células en el filtro inferior con respecto al número total de células presentes en ambos filtros.

1.3.7 PCR cuantitativa

Para la qPCR se purificó el ADNc sobre columnas Microspin G-50 (GE Healthcare, Múnich, Alemania) y se cuantificó mediante espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000. Kisker-Biotechnology, Steinfurt, Alemania). Se diseñaron cebadores para qPCR con el programa DNA Star y se produjeron por MWG (Ebersberg, Alemania). Se usó β-actina como patrón interno. Se realizó la reacción de PCR con la mezcla maestra SYBRgreen (Applied biosystems, Darmstadt, Alemania).

1.3.8 Ensayo de unión celular

Se describen ensayos de unión celular a L1-Fc o fibronectina en detalle en Oleszewski *et al* (JCB 2000).

1.3.9 Modelo tumoral y terapia

A ratones CD1 *nu/nu* atímicos hembra, libres de patógenos (7-9 semanas de edad; 20 g de promedio; Charles River) se les inocularon 5 x 10⁶ células de carcinoma de ovarios humanas marcadas con *lacZ* (SKOV3ip-*lacZ*) en la cavidad peritoneal en el día 0, conduciendo a una formación de tumor i.p. en el plazo de 5 semanas. Se diluyeron Acm anti-L1 en PBS estéril hasta la concentración necesaria para el tratamiento. Se trataron ratones portadores de tumor i.p. dos veces por semana con una disolución de 300 µl de la dosificación respectiva (10 mg/kg por aplicación, respectivamente), vehículo (PBS) o control de anticuerpo Hea125. Los tratamientos con anticuerpos comenzaron a partir del día 3 tras la inyección de células tumorales para dar a las células tumorales tiempo para fijarse al lado interno de la pared abdominal y las superficies de los órganos i.p. En la autopsia (día 38), se tomaron muestras de ascitis de todos los ratones y se determinó el volumen. Se extirparon todos los órganos i.p. (incluyendo la masa tumoral), la pared abdominal y el diafragma, se tiñeron con sustrato de β-galactosidasa (X-gal; Roche-Diagnostics, Penzberg, Alemania), se fotografiaron y se pesaron. Se extirpó la masa tumoral de color azul índigo entre los órganos, en el diafragma y en el lado interno de la pared abdominal, y se pesó sola. Se calculó la carga tumoral relativa en cada ratón dividiendo el peso de la masa tumoral entre el peso de los sitios totales.

2. Ejemplo 2

Humanización del anticuerpo murino anti-L1 L1_9.3

Con el fin de humanizar el anticuerpo murino anti-L1 L1_9.3, se usaron los genes de la familia de cadena humana v-kappa 1 (humκ1), y pesada variable III (humIII) como las secuencias aceptoras. El sistema de numeración usado en el presente documento para estos genes se adopta de Wu y Kabat (Kabat, E. A, Wu, T. T., Perry, HM, Gottesman, KS y Foeller, C (1992) Sequences of proteins of immunological interest, Diane Books Publishing company). Se

alinearon las secuencias de aminoácidos de cadenas ligera y pesada del anticuerpo murino L1_9.3 frente a las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera humκ1 y la cadena pesada humIII, respectivamente. Se generaron dos anticuerpos L1_9.3 humanizados (L1_9.3Hu y L1_9.3Hu3) sustituyendo las CDR correspondientes del anticuerpo murino L1_9.3 por las seis CDR del anticuerpo humano.

5

Ubicaciones de las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR)

Bucle	Esquema de numeración de Kabat
LCDR1	L24--L34
LCDR2	L50--L56
LCDR3	L89--L97
HCDR1	H31--H35B
HCDR2	H50--H65
HCDR3	H93--H101

Se transfirieron varios residuos de la región de entramado del anticuerpo murino L1_9.3 a los anticuerpos L1_9.3 humanizados:

10 Versión 1 (L1_9.3Hu) anticuerpo humanizado – se transfirieron los números de residuo de la cadena pesada 6, 23, 27, 30, 43, 49, 71, 73, 76, 78 y 94, y el número de residuo de la cadena ligera 100 del anticuerpo murino L1_9.3 y se sustituyó el número de residuo de la cadena ligera 73 por el correspondiente (Phe) encontrado en esta posición en la cadena ligera de anticuerpo REI humano.

15 Versión 2 (L1_9.3Hu3) anticuerpo humanizado – se transfirieron los números de residuo de cadena pesada 6, 23, 27, 30, 71, 73 y 94, y el número de residuo de cadena ligera 100 del anticuerpo murino L1_9.3.

Entonces se generaron secuencias de ADN que codificaban para análogos de fragmento variable de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo murino L1_9.3 y las dos versiones humanizadas de este anticuerpo (L1_9.3Hu y L1_9.3Hu3) para su expresión en *E. coli*. Todos estos scFv contienen el mismo ligador (TSGPGDGGKGGPGKGGEGTKGTGPGG). Los genes de scFv se sintetizaron por GeneArt AG, Alemania.

En las figuras 8a y 8b, respectivamente, se proporcionan las secuencias de ADN de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo usadas para construir los anticuerpos humanizados.

25 Las figuras 9a - 9c proporcionan las secuencias de aminoácidos del scFv de L1_9.3 murino y los scFv de L1_9.3Hu y L1_9.3Hu3 humanizados, respectivamente.

3. Ejemplo 3

30 Clonación de ADN que codifica para los scFv de L1_9.3, L1-9.3Hu y L1-9.3Hu3 en vectores de expresión periplasmática de *E. coli* y transformación de *E. coli* con estos vectores.

35 La expresión periplasmática de scFv es beneficiosa por varios motivos. En primer lugar, tales scFv escapan al interior del sobrenadante bacteriano y a partir de ahí pueden someterse a ensayo de manera conveniente para determinar la unión a su antígeno relacionado (en este caso, el antígeno de cáncer L1). En segundo lugar, la expresión periplasmática permite la purificación de scFv activos solubles.

40 Las secuencias de ADN que codifican para los scFv de L1_9.3, L1-9.3Hu y L1_9.3Hu3 sintetizadas por GeneArt AG, Alemania no se suministraron en un vector de expresión periplasmática de *E. coli*. Por tanto, se clonaron estas secuencias de ADN en un vector de expresión periplasmática de *E. coli* usando los siguientes métodos.

Se rescataron mediante PCR los ADN que codificaban para los scFv sintetizados con los siguientes pares de cebadores usando condiciones y reactivos de PCR convencionales:

45

scFv	Par de cebadores
L1_9.3	Yol811 y Yol812
L1-9.3Hu	Yol813 y Yol814
L1_9.3Hu3	Yol813 y Yol814

A continuación se muestran las secuencias de cebadores.

Yol811 AGCCGGCCATGGCCGATATTCAGATGACCCAGAC

50

Yol812 TCTATGCAGCGGCGGCACCGCCGCTGCTCACGGTAACGCTG

Yol813 AGCCGGCCATGGCCGATATTCAGATGACCCAGAG

Yol814 TCTATGCAGCGGCCGACCGCCGCTGCTCACGGTAACCAGGGTG

Se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,6% y se escindieron y purificaron las bandas de tamaño correcto. Se sometieron los productos de PCR a digestión doble con enzimas de restricción *NcoI* y *NotI* en condiciones convencionales seguido por nueva purificación. Se ligaron los productos de PCR en un vector de expresión periplasmática inducible por IPTG que contenía:

- una secuencia líder pelB para dirigir los polipéptidos codificados al periplasma en el que entonces se escinde esta secuencia líder

- sitios de clonación *NcoI/NotI*

- la región constante de cadena kappa de anticuerpo humano.

Se transformaron los vectores ligados en células *E. coli* TG1 y se sembraron en placas sobre 2xTY agar (Bacto triptona 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l, Bacto agar 15 g/l y NaCl 5 g/l) complementado con ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2%. En las figuras 10a, 10b y 10c, respectivamente, se muestran las secuencias de ADN y de aminoácidos de las porciones expresadas de constructos de scFv de L1_9.3, L1-9.3Hu y L1_9.3Hu3.

4. Ejemplo 4

Expresión de anticuerpos de cadena sencilla L1_9.3, L1-9.3Hu y L1_9.3Hu3 en *E. coli*

Los polipéptidos expresados por estos vectores incluyen la región constante c kappa de anticuerpo humano fusionada con los extremos C-terminales de los scFv. Estos constructos que contienen cadena constante c kappa se denominan en el presente documento anticuerpos de cadena sencilla.

Se escogieron ocho clones de *E. coli* por cada constructo de anticuerpo de cadena sencilla, L1_9.3, L1_9.3Hu y L1_9Hu3, (24 clones en total) en pocillos separados de una placa de 96 pocillos que contenía 300 µl de 2xTY (Bacto triptona 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l y NaCl 5 g/l) complementado con ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2%. Cada pocillo tenía un volumen de 1 ml. Se hicieron crecer los cultivos con agitación (200 rpm) a 37°C hasta que los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Entonces se centrifugaron las placas de 96 pocillos a 3200 rpm durante 10 min y se aspiró el sobrenadante y se descartó. Se resuspendieron los sedimentos bacterianos en 400 µl de 2XTY nuevo complementado con ampicilina 100 µg/ml e IPTG 1 mM para inducir la expresión de los anticuerpos de cadena sencilla. Se agitaron los cultivos a 200 rpm durante la noche a 25°C.

Al día siguiente se centrifugó la placa de 96 pocillos a 3200 rpm durante 10 min para sedimentar las células. Se conservó el sobrenadante que contenía los anticuerpos de cadena sencilla contra L1 expresados para el análisis mediante ELISA.

5. Ejemplo 5

Ensayo ELISA de unión de los scFv de L1_9.3, L1-9.3Hu y L1_9.3Hu3 a antígeno de cáncer L1 humano

Se llevó a cabo este ensayo ELISA con el fin de confirmar que el procedimiento de humanización no había conducido a una pérdida de unión de anticuerpo al antígeno de cáncer L1 y para identificar cuáles de los clones escogidos expresaban correctamente los constructos de anticuerpo de cadena sencilla.

Se recubrieron tres filas de una placa de 96 pocillos con 100 µl de antígeno L1 que comprendía el dominio extracelular de la proteína L1 fusionado con un fragmento Fc (5 µg/ml) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se recubrieron tres filas adicionales con estreptavidina (5 µg/ml) en PBS como control.

Se lavaron los pocillos tres veces con 370 µl de PBS y se bloquearon con leche en polvo al 3% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se mezclaron 50 µl de cada sobrenadante bacteriano durante la noche con 50 µl de leche en polvo al 6% en PBS durante 1 hora.

Se lavó la placa de ELISA bloqueada dos veces con PBS tal como se describió anteriormente y se añadieron los sobrenadantes bloqueados que contenían anticuerpo de cadena sencilla y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.

Se lavó la placa de 96 pocillos cuatro veces con PBS/tween al 0,1% seguido por la adición de 100 µl de una dilución de 1:5000 de conjugado de HRP y anticuerpo unido y libre anti-cadenas ligeras kappa humanas (Sigma A7164) en PBS/BSA al 1%. Se incubó el conjugado durante 1 h a temperatura ambiente seguido por cinco lavados con PBS/tween al 0,1%.

Se reveló el ensayo ELISA mediante la adición de kit de sustrato de peroxidasa para micropocillos de 2 componentes TMB (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., EE.UU.) según el protocolo del fabricante. En la figura 4 se muestra una imagen de la placa de ELISA. Se observaron al menos cuatro clones de unión a L1 para cada una de las tres versiones de anticuerpo de cadena sencilla. Estos clones de anticuerpo de cadena sencilla de unión a L1 no se unen a estreptavidina.

La figura 11 muestra la unión de los scFv de L1_9.3, L1-9.3Hu y L1_9.3Hu3 al antígeno de cáncer L1 humano. Se recubren las filas A, B y C con L1 y se recubren las D, E y F con estreptavidina. El color azul en los pocillos indica unión del scFv individual al L1 en la placa. La ausencia de color en las filas recubiertas con estreptavidina muestra que los anticuerpos de cadena sencilla se unen específicamente a L1.

6. Ejemplo 6

Determinación de la afinidad de unión

Se sometieron a ensayo anticuerpo de ratón L1-9.3 y anticuerpo humanizado L1-hu3 mediante análisis Biacore (Biacore AB, Uppsala, Suecia) para determinar la cinética de unión.

Se activó un chip sensor CM5 de Biacore con EDC/NHS y se acopló fragmento extracelular de L1-Fc recombinante purificado (515 µg/ml en PBS) al chip sensor CM5 a entre 200 y 3000 UR. Se bloquearon los sitios activos restantes mediante etanolamina/HCl. Se midió la unión de anticuerpo añadiendo anticuerpo a concentraciones de desde 6 hasta 3333 nM a una velocidad de flujo de 10 µl/min usando la función Kinject. Se regeneró el chip con glicina 10 mM pH 2,0 con NaCl 500 mM para retirar los anticuerpos unidos.

Se ajustaron las curvas de unión a un modelo de unión de Langmuir usando software BIAevaluation (Biacore AB, Uppsala, Suecia). En la tabla 2 se muestran los valores de KD determinados.

Tabla 2

Anticuerpo	L1-9.3	L1-hu3
Ka [1/Ms]	$2,6 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$
Kd [1/s]	$2,2 \times 10^{-5}$	$6,5 \times 10^{-5}$
KD [M]	$8,5 \times 10^{-11}$	$8,1 \times 10^{-11}$

Tabla 2: La variante humanizada L1-hu3 presenta una alta afinidad por diana similar al anticuerpo original L1-9.3.

7. Ejemplo 7

Unión de anticuerpo a CMSP y células cancerosas

Se obtuvieron CMSP mediante centrifugación por gradiente de densidad a partir de sangre completa con EDTA de donantes humanos sanos. Se recogieron células tumorales OVMZ cultivadas mediante tripsinación. Se sembraron 1×10^5 células/pocillo (75 µl) en tubos de FACS. Se prepararon diluciones de Acm L1-9.3 en medio de cultivo con EDTA 10 mM y se añadieron 75 µl/pocillo de dilución de Acm contra L1, a CMSP y células OVMZ para dar como resultado concentraciones finales de entre $6,6 \times 10^{-13}$ y $6,6 \times 10^{-8}$ M. Posteriormente se incubaron las células durante la noche (~24 h) a 37°C/CO₂ al 5% en una incubadora. Se lavaron las células directamente en tubos de FACS usando 2 ml de tampón de FACS seguido por centrifugación a 300 g/5 min/4°C. Se retiró el sobrenadante mediante pipeteado. Para la tinción, se añadió un anticuerpo secundario de mono marcado con PE anti-ratón (Dako) a un volumen de 150 µl/pocillo seguido por incubación durante 30 min a 4°C. Se repitieron etapas de lavado como anteriormente y se fijaron las células en 200 µl de PBS/formaldehído al 1%. Entonces se midió la fluorescencia media de la muestra mediante análisis de FACS.

Tal como se muestra en la figura 13, el Acm L1-9.3 presenta una afinidad fuertemente reducida por L1 en CMSP en comparación con L1 tumoral. Se detectó unión de L1-9.3 a CMSP en el intervalo nanomolar (línea discontinua), mientras que pudo observarse unión a células tumorales a concentraciones picomolares (línea continua). B) Se estimaron las constantes de disociación K_D a partir de las curvas de regresión usando la concentración a la mitad de la unión máxima. K_D de L1-9.3 en CMSP fue al menos 400 veces inferior a aquella en células tumorales.

8. Ejemplo 8

Determinación de liberación de citocina

Se obtuvieron CMSP mediante centrifugación por gradiente de densidad a partir de sangre completa con citrato de donantes humanos sanos. Se resuspendieron las células en RPMI 1640/suero humano al 5%/5 ml de NEAA/5 ml de L-glutamina/5 ml de piruvato de sodio. Se sembraron 1×10^5 células por 100 µl en placas de 96 pocillos de fondo

redondo. En una segunda etapa, se añadieron 100 µl de medio que contenía LPS (10 ng/ml), Acm L1-9.3 (20 µg/ml), Acm OKT3 (Ebioscience) (75 ng/ml) o ionomicina/PMA (1 µg/ml / 5 ng/ml) por triplicado seguido por una incubación durante 24 h a 37°C, CO₂ al 5%. Como control negativo se usaron CMSP sin tratar. Tras 24 h, se midieron los niveles de las citocinas interferón-gamma y factor de necrosis tumoral mediante análisis de FACS usando los conjuntos flexibles para citocinas CBA (BD) según la información del fabricante.

En la figura 14 se representan los niveles de citocinas resultantes. Al contrario que el Acm OKT3, ionomicina/PMA y LPS, L1-9.3 no aumentó significativamente la liberación de TNF o IFN-gamma por CMSP.

9. Ejemplo 9

Ensayo de proliferación de células T

Se obtuvieron CMSP mediante centrifugación por gradiente de densidad a partir de sangre completa con citrato de dos donantes humanos sanos. Se sembraron 1x10⁵ células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano. En una segunda etapa, se añadieron 100 µl de medio que contenía o bien Acm L1-9.3 (20 µg/ml) y OKT3 (Ebioscience, 75 ng/ml) o bien Acm L1-9.3 (20 µg/ml) u OKT3 (75 ng/ml) por triplicado. Tras 1 h, los dos últimos se complementaron con OKT3 o L1-9.3, respectivamente. Para excluir cualquier activación relacionada con el anticuerpo, se incubaron CMSP con o sin L1-9.3 en ausencia de OKT3. Tras una incubación durante 24 h a 37°C, CO₂ al 5%, se evaluó la proliferación de células T usando un ensayo de incorporación de BrdU (Roche) según la información del fabricante.

A partir de los resultados mostrados en la figura 15, puede concluirse que el Acm L1-9.3 no induce la proliferación de células T ni inhibe la proliferación de células T inducida por OKT3.

10. Ejemplo 10

Dependencia de la glicosilación de la unión de anticuerpo

Se sembraron 2x10⁶ células SKOV3ip en una placa de Petri de 10 cm y se incubaron durante 24 h a 37°C, CO₂ al 5%. Tras 24 h, se lavaron las células con PBS y se sometieron a lisis con 500 µl de reactivo M-PER (Pierce) según el protocolo descrito en el kit de inmunoprecipitación de mamíferos clásico Seize (Pierce). Se desglicosilaron los lisados de células SkOv3ip tal como se describe en el kit Enzymatic CarboRelease (QA_Bio). En resumen, se añadieron 2,5 µl de disolución de desnaturalización a 35 µl de lisado celular. Se incubó la muestra en un termobloque a 100°C durante 5 min y después se enfrió en hielo. Finalmente se añadieron 2,5 µl de Triton-X y 1 µl de cada glicosidasa contenida en el kit Enzymatic CarboRelease (QABio) (PGNasa F, O-glicosidasa, sialidasa, β-galactosidasa, glucoaminidasa) según el protocolo del fabricante seguido por una incubación a 37°C durante 3 h. Se sometieron productos glicosilados y desglicosilados a SDS PAGE y posterior inmunotransferencia de tipo Western. Se incubaron las inmunotransferencias de tipo Western con diferentes anticuerpos contra L1 dependiendo de su rendimiento de tinción. Se usaron concentraciones de 1 µg/ml (9.3, 11A y 14.10), 5 µg/ml (35.9) o 10 µg/ml (OV52.24, OV543.18, 38.12, OV549.20). Se detectó la unión de anticuerpo contra L1 a la inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo marcado con HRP anti-ratón (Dianova).

Tal como se muestra en la figura 16, los anticuerpos anti-L1 sometidos a prueba pueden dividirse en tres clases con respecto a su dependencia de la glicosilación: Primera clase (no afectada por la glicosilación): L1-9.3. Segunda clase (la unión en WB se vio afectada de manera negativa por la desglicosilación): 11A, 14.10, OV52.24 y OV549.20. Tercera clase (la unión en WB se vio afectada de manera positiva por la desglicosilación): 35.9 y 38.12.

11. Ejemplo 11

Biodistribución de L1-9.3 en conejo

A un conejo hembra (blanco del Himalaya) se le inyectó dos veces L1-9.3 (0 h, 24 h) mediante la vía de aplicación intravenosa a una dosis de 10 mg/kg. 1 animal de control recibió un volumen comparable de PBS. Se realizó la autopsia de los animales 72 h tras la primera aplicación. Se fijaron los órganos en formalina tamponada al 4% y se incrustaron en parafina. Se prepararon cortes histológicos y se realizó inmunohistoquímica. Se tiñeron secciones tisulares del animal tratado con L1-9.3 y el control con un anticuerpo anti-ratón para detectar la unión de L1-9.3 tras la aplicación intravenosa. Se visualizaron señales mediante DAB (Sigma). Se usaron dos sistemas de detección diferentes, método de complejo de avidina/biotina convencional o método de sistema de amplificación de señal por tiramida CSA II (Dako), que permitieron una estimación basta de la cantidad de L1-9.3 unido *in vivo*. El método de complejo de avidina/biotina convencional (Vector Laboratories) puede detectar concentraciones de L1-9.3 de 50 ng/ml o superiores, mientras que el sistema de amplificación de señal por tiramida libre de biotina CSA II (Dako) tiene un límite de detección de 5 ng/ml. Para determinar el patrón de expresión de L1, se incubaron tejidos del animal de control con anticuerpo L1-9.3 primario y con el anticuerpo de detección. Para el método de ABC se usó un anticuerpo anti-ratón biotinilado (Dianova, dilución de 1:3000) como anticuerpo de detección, el método de CSA se

realizó según el protocolo del fabricante.

La figura 17 muestra la unión *in vivo* de L1-9.3 aplicado por vía intravenosa a túbulo colectores del riñón. Sólo pudo detectarse unión *in vivo* usando el sistema de amplificación de CSA (figura 17A), mientras que usando el método de ABC convencional no podía verse ninguna señal (figura 17B). Por tanto, se detectó L1-9.3 en un intervalo de 30-300 pmol en el tejido (se supone que la concentración de L1-9.3 es superior a 5 ng/ml e inferior a 50 ng/ml). El control negativo no mostró ninguna tinción, por tanto, puede descartarse la tinción no específica (figura 17C). El patrón de tinción de L1-9.3 unido *in vivo* (figura 17A) corresponde al patrón de expresión de L1 en el riñón cuando se tiñen directamente secciones tisulares con L1-9.3 (figura 17D). Puede concluirse que el anticuerpo L1-9.3 administrado por vía intravenosa puede extravasarse al tejido periférico.

12. Ejemplo 12

Función de formas humanizadas de Acm L1-9.3 en ratones desnudos

Se investigó si la forma humanizada del Acm L1-9.3 también podía inhibir el crecimiento tumoral de carcinoma de ovarios *in vivo*. En primer lugar, se analizó la unión de las dos formas humanizadas de L1-9.3 a la línea celular seleccionada. Por tanto, se realizó citometría de flujo con células SKOV3ip con pcDNA3.1-luciferasa (figura 18). Ambos Acm mostraron una fuerte unión a la línea de células tumorales, y dieron resultados de unión similares al Acm L1-9.3 nativo.

Se inyectaron células SKOV3ip con pcDNA3.1-luciferasa en ratones inmunodeficientes 24 h antes de iniciar la terapia. Se inyectaron anticuerpos humanizados (300 µg) o PBS tres veces por semana por vía intraperitoneal. Para detectar el crecimiento tumoral *in vivo*, se obtuvieron imágenes de los ratones una vez por semana usando el sistema Xenogen IVIS 200. Se anestesiaron los ratones y se les inyectó luciferina D, seguido por detección de la emisión de luz que se produce durante la actividad luciferasa de las células tumorales. Durante el transcurso de tiempo se detectó un crecimiento tumoral más lento en el grupo de ratones tratados con Acm humanizado en comparación con el control. En el día 33 se tomaron los últimos datos de obtención de imágenes. Los resultados de obtención de imágenes dieron un volumen tumoral disminuido de aproximadamente el 80% usando el Acm hu3 y de aproximadamente el 50% para chiL1-9.3. Ambos resultados fueron fuertemente significativos (figura 19). Tras 36 días se sacrificaron los ratones y se determinó la masa tumoral. En ambos grupos tratados con Acm anti-L1 humanizados se midió una masa tumoral disminuida sustancial en comparación con el grupo de PBS (figura 20 (A, B)).

13. Ejemplo 13

Se sometió a prueba la supresión de la quimiorresistencia mediante tratamiento con anticuerpo monoclonal 9.3 anti-L1CAM tal como se describe en el documento WO 2008/046529, ejemplo 3 (véase también la figura 17e del documento WO 2008/046529). En las figuras 21 y 22 se muestran los resultados. Pudo demostrarse que el anticuerpo monoclonal 9.3 suprime la quimiorresistencia. Su efecto parece ser más fuerte que los del anticuerpo 11A sometido a prueba en el documento WO 2008/046529.

Tabla 1

Acm	FACS	Inmuno-transferencia de tipo Western	IP	L1-Fc	Invasión	fosfo-Erk	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	crecimiento tumoral
L1-9.3	+++	+++	+++	+++	-60%	-50%	2,6E+05	2,2E-05	8,5E-11	-60%
L1-11A	+++	+++	+++	+++	-50%	-40%	1,0E+05	4,0E-06	4,0E-11	-40%
L1-14.10	+	++	+	+++	-40%	-40%	1,4E+04	1,0E-06	7,1E-11	-30%
L1-38.12	+	+++	+	+++	0	0	3,7E+04	2,0E-06	5,4E-11	
L1-35.9	+	+++	+	+++	0	0	4,0E+04	1,2E-05	3,0E-10	
L1-N15.17	++	-	++	++	0	0	5,3E+04	1,0E-03	1,9E-08	
L1-1D12.22	-	-	+	++	0	-20%	2,3E+04	1,0E-04	4,3E-09	
L1-1D17.3	-	-	+	++	0	0	2,3E+04	1,0E-04	4,3E-09	
L1-1D64.8	-	+++	+	+++	0	0	8,5E+04	1,5E-04	1,8E-09	
L1-1D74.8	-	+++	+	+++	-10%	0	3,0E+04	2,0E-03	6,7E-08	

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal anti-L1
- 5 i) que puede unirse al mismo epítipo de L1 reconocido por el anticuerpo monoclonal 9.3, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841, y que se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} , o
- 10 ii) caracterizado porque sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) tienen las siguientes secuencias: LCDR1: RASQDISNILN, LCDR2: YTSRLHS, LCDR3: QQGNTLPWT, HCDR1: RYWML, HCDR2: EINPRNDRTNYNEKFKT y HCDR3: GGGYAMDY, y que se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} , o
- 15 iii) un anticuerpo monoclonal, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841.
2. Anticuerpo monoclonal anti-L1 según la reivindicación 1 i), en el que el epítipo está dentro del primer dominio similar a inmunoglobulina de L1.
- 20 3. Anticuerpo humanizado que comprende las CDR no humanas de un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2, y una región de entramado (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana, en particular, que comprende la secuencia de L1_9.3hu o L1_9.3hu3 tal como se muestra en la figura 8 a) y b).
- 25 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, unido a una sustancia activa, preferiblemente una toxina, una citocina, una nanopartícula o un radionúclido.
5. Célula de hibridoma
- 30 (i) que produce el anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o
- (ii) depositada como DSMZ ACC2841.
6. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad tumorigénica,
- 35 a) preferiblemente en un paciente tratado anteriormente con un fármaco quimioterápico o con radioterapia, más preferiblemente en el que el paciente es al menos parcialmente resistente al tratamiento con dicho fármaco quimioterápico o con radioterapia, o
- 40 b) preferiblemente en un paciente al menos parcialmente resistente al tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia dados, o
- c) preferiblemente en el que el anticuerpo se administra en combinación con un fármaco quimioterápico o con radioterapia, más preferiblemente en el que el fármaco quimioterápico o la radioterapia se administran antes que el anticuerpo anti-L1.
- 45 7. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de sensibilización de células tumorales en un paciente para el tratamiento con un fármaco quimioterápico o con radioterapia,
- 50 en particular en el que las células son al menos parcialmente resistentes al tratamiento con dicho fármaco quimioterápico o a radioterapia,
- incluso más en particular en el que tras la sensibilización con el anticuerpo anti-L1 el paciente se trata adicionalmente con dicho fármaco quimioterápico o con radioterapia.
- 55 8. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que las células tumorales o la enfermedad tumorigénica son de un tipo seleccionado del grupo que consiste en astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma, meduloblastoma, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer endometrial, cáncer renal, neuroblastomas, carcinomas escamosos, meduloblastomas, hepatoma, cáncer de colon y mesotelioma y carcinoma epidermoide, o,
- 60 en el que las células tumorales son de un tumor epitelial o la enfermedad tumorigénica es un tumor epitelial, en particular en el que el tumor epitelial es cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovarios o cáncer endometrial.
- 65

- 5 9. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el fármaco quimioterápico es un agente que daña el ADN, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en actinomicina D, mitomicina C, cisplatino, doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina, 5-FU, taxanos, preferiblemente paclitaxel y carboplatino, o, en el que la radioterapia se selecciona del grupo que consiste en radiación de rayos X, radiación UV, irradiación γ , irradiación α o β y microondas.
- 10 10. Composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 10

Figura 1

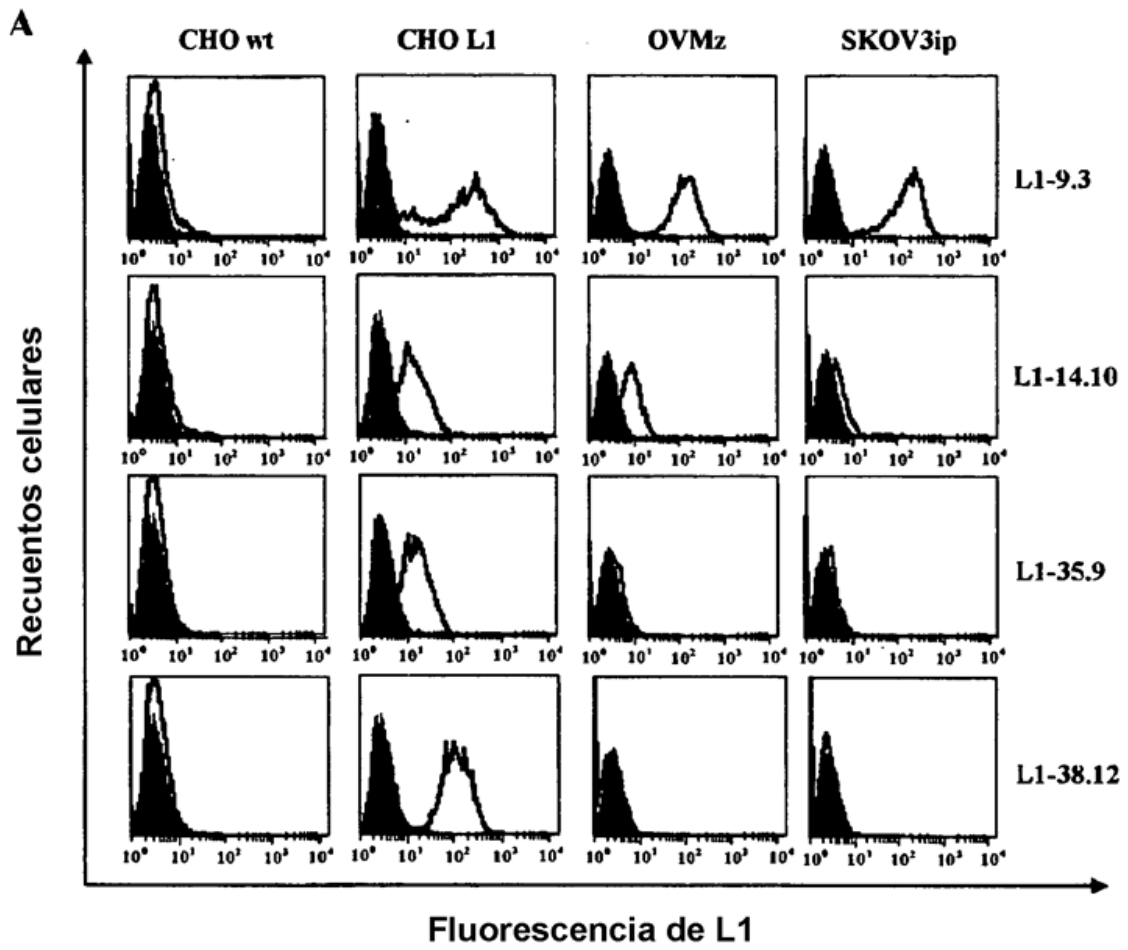


Figura 1

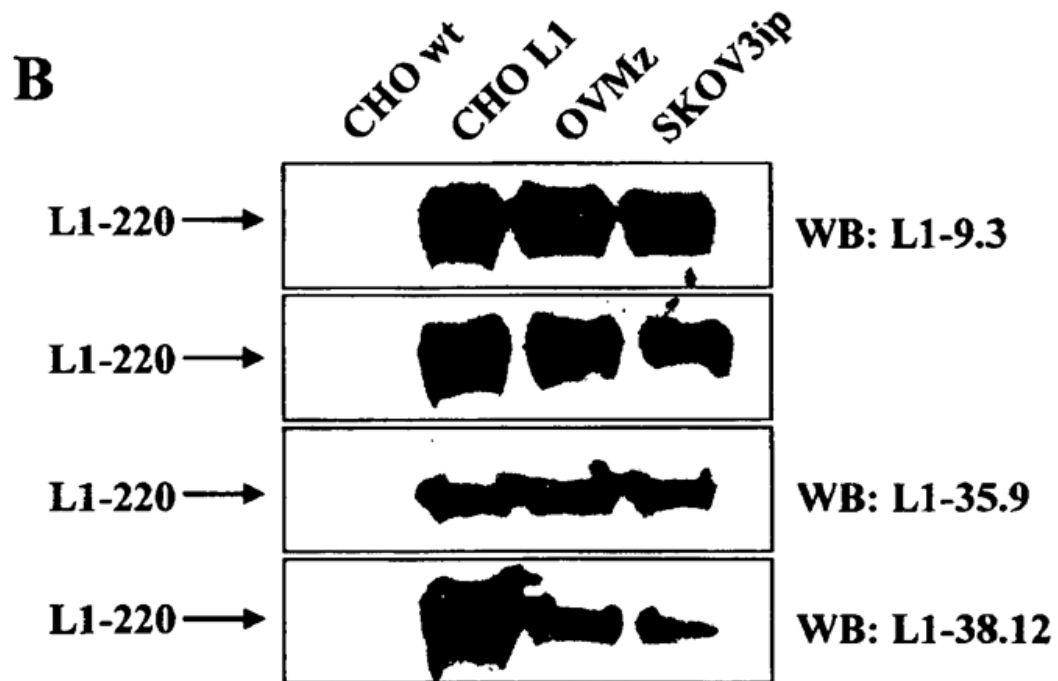
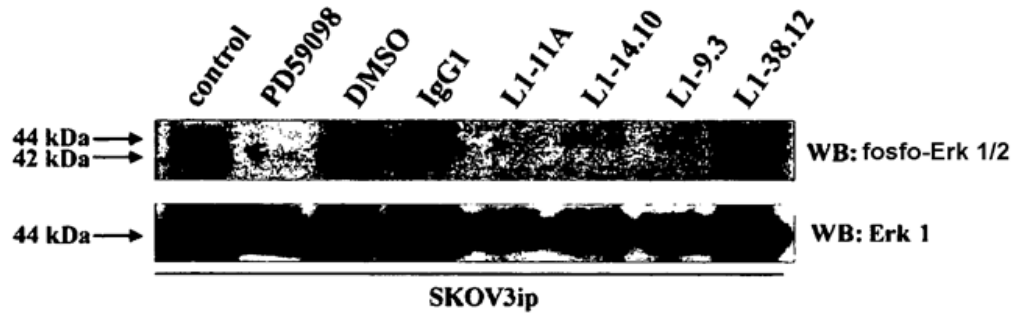


Figura 2

A



B

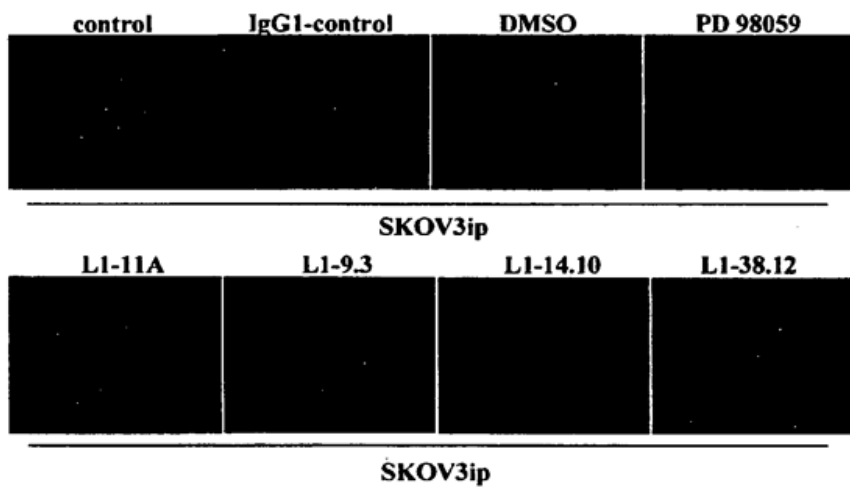


Figura 3

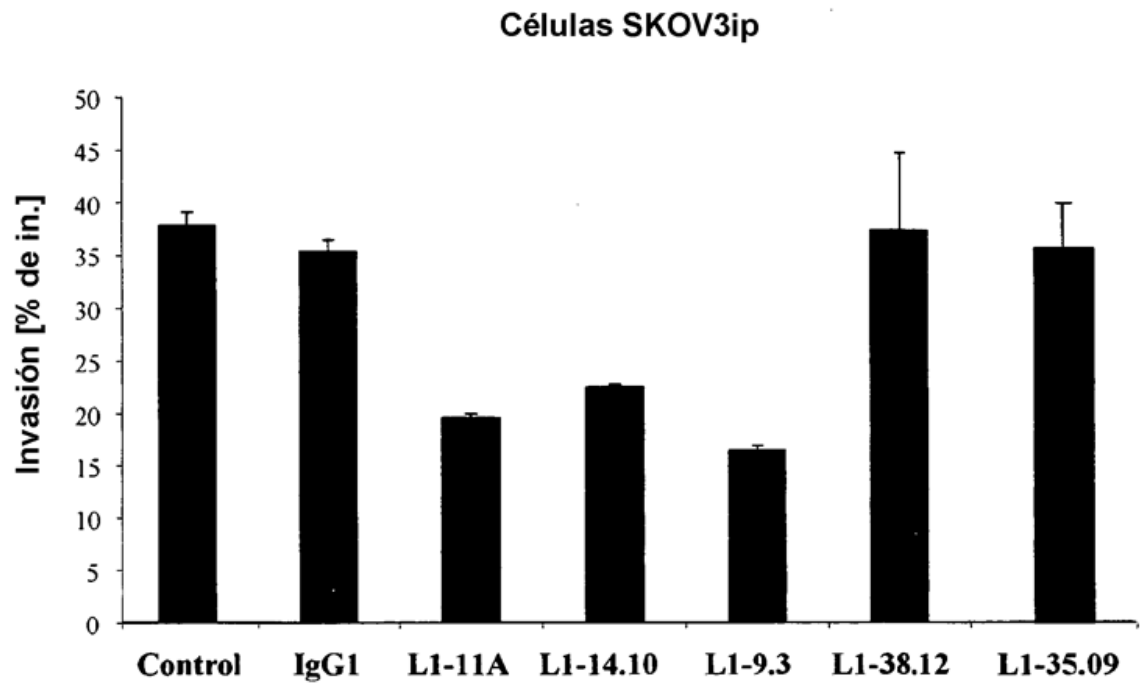
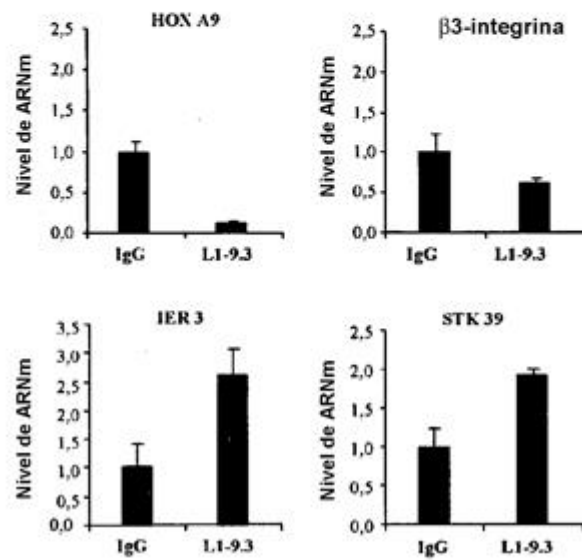


Figura 4

A

Células SKOV3ip + Acm



B

Células SKOV3ip + ARNip de L1

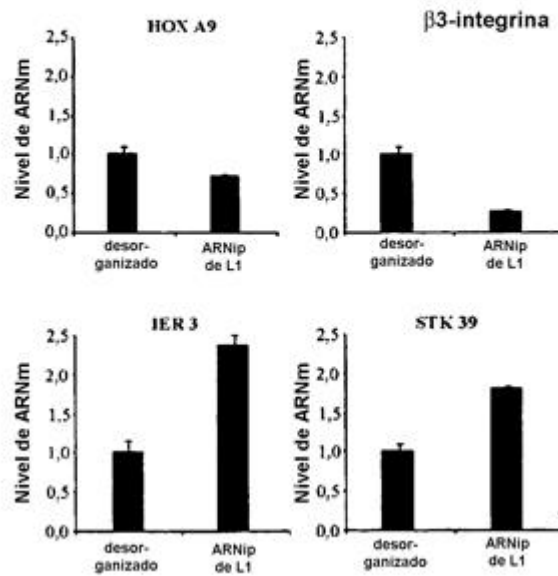
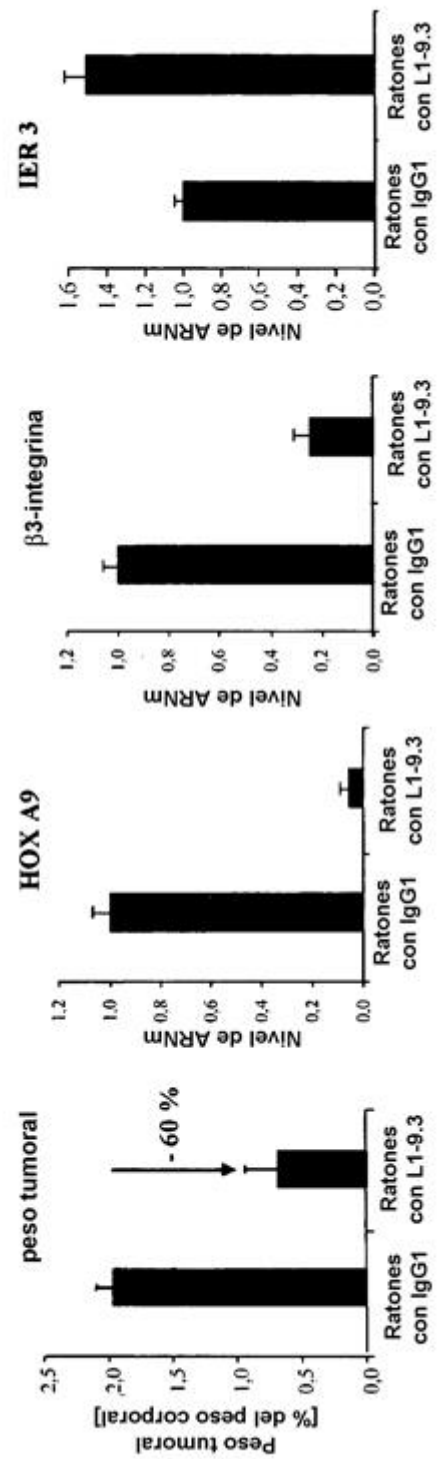


Figura 4



C

Figura 5

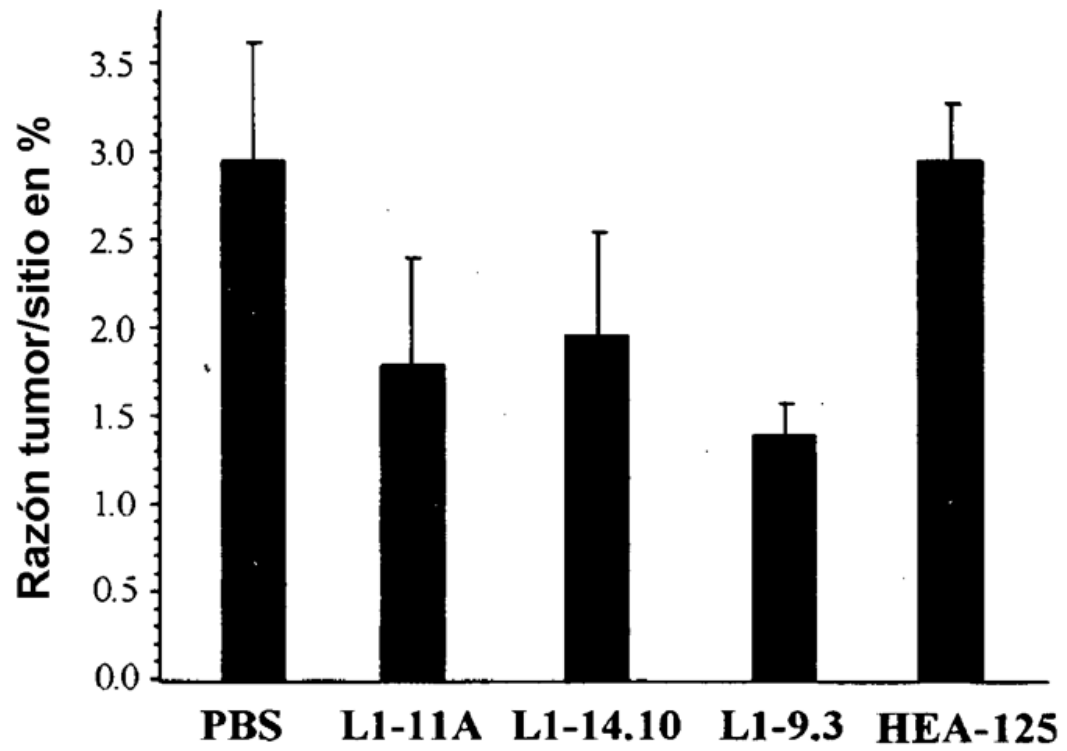


Figura 6

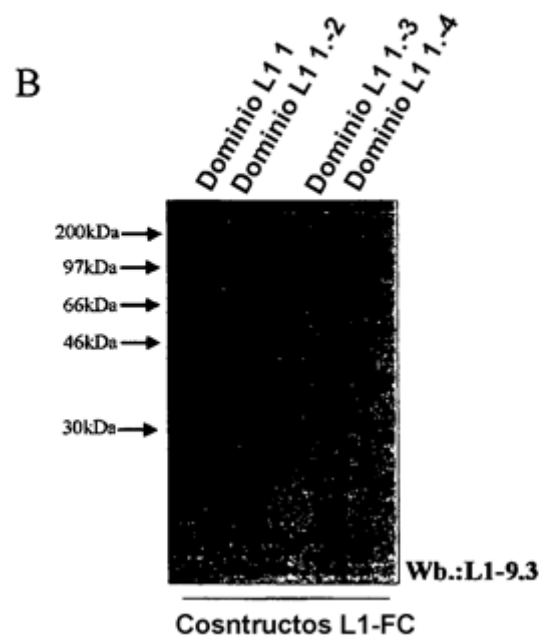
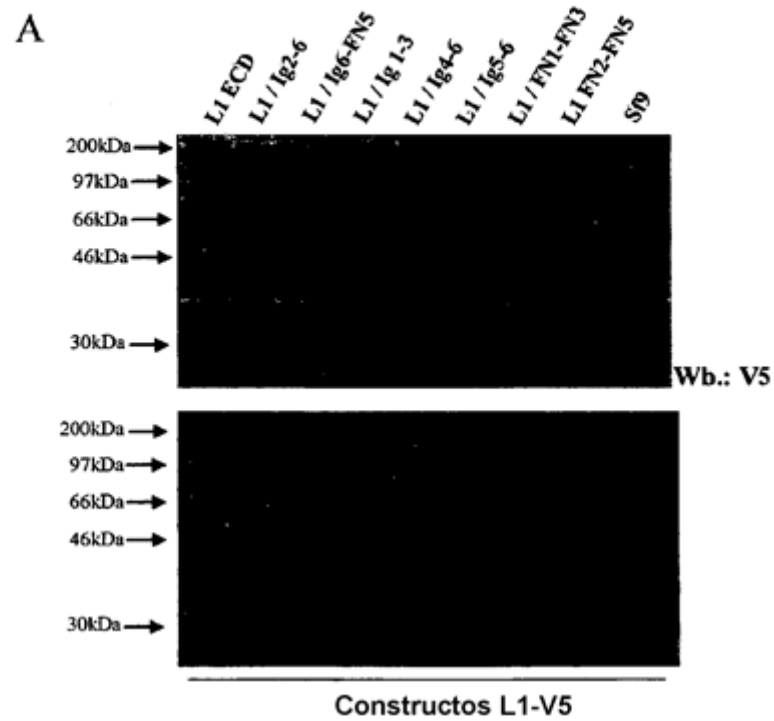
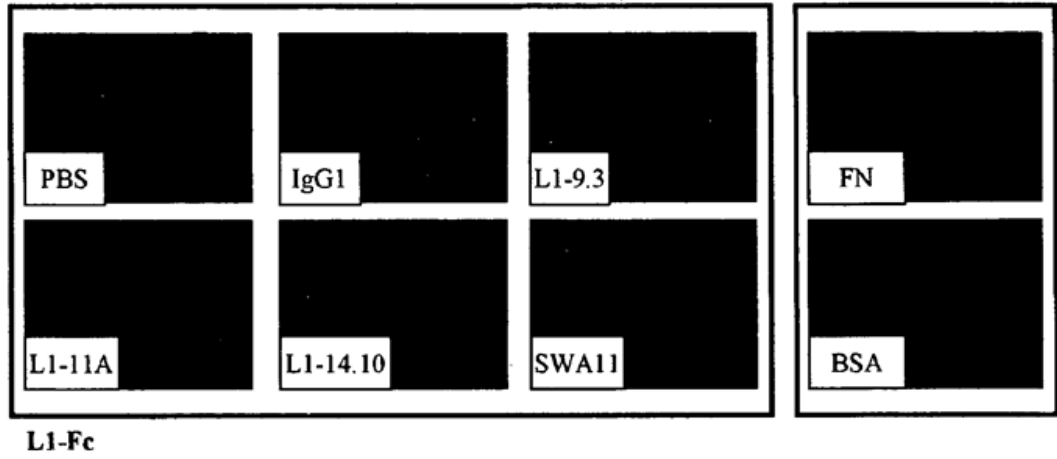


Figura 7

A



B

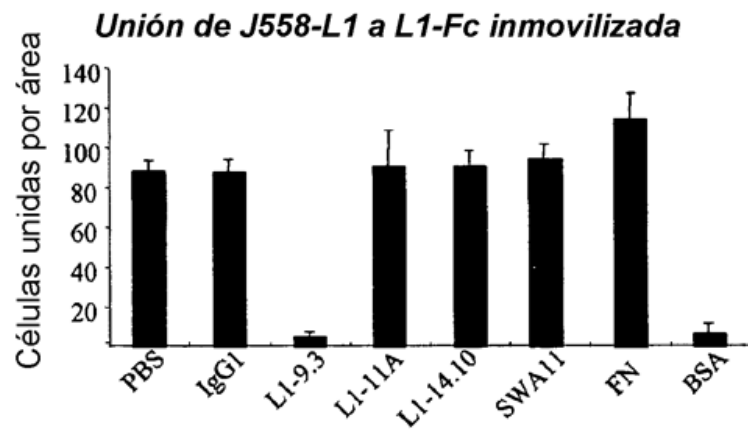


Figura 8

a)

Secuencias de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo

nombre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CDR3	1	1
L1_9.3	12345678901234567890123	456789012345678901234	DISNYLN	567890123456789	0123456	78901234567890123456789				90123456789012345678901234567890	0	1
Hum1	DIGNOTSSLSGAFGRVNTTC	IASQ	DISNYLN	WIDQKPGKPLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGTGYSLTISNLEQEDPATYTC				QGGNTLP	WT	1
RET	DIGNOTSSLSGAFGRVNTTC	RASQSV	DISNYLN	WIDQKPGKPLLIY	AASSLS	GVPSRFSGSGTGYSLTISNLEQEDPATYTC				QGGNTLP	YT	1
L1_9.3hu	DIGNOTSSLSGAFGRVNTTC	QASQ	DISNYLN	WIDQKPGKPLLIY	PASMLA	GVPSRFSGSGTGYSLTISNLEQEDPATYTC				QGGNTLP	WT	1
L1_9.3hu3	DIGNOTSSLSGAFGRVNTTC	RASQ	DISNYLN	WIDQKPGKPLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGTGYSLTISNLEQEDPATYTC				QGGNTLP	WT	1

b)

Secuencias de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo

nombre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	CDR3	1	1
L1_9.3	123456789012345678901234567890			67890123456789012345	0123456789012345	67890123456789012345678901234				567890123456789012345678901234567890123	0	1
Hum1	QVQLVQPGQLLWVSGASVWLSQASGCTFT			WYRQPGGLEWV	EINP	RNDRTNNEKFT	KATITVDSSSTAYWOLTSFSSDSAVYTCAL			GGGVAN	DN	1
L1_9.3hu	EVQLVSGGGLVQPGASLRSLSCASGCTFT			WYRQPGGLEWV	VIS	NGSDTTADSYNG	RTTISDSSRTLYLONHSLAREDTAVYTCAL			ESSEFD	VI	1
L1_9.3hu3	EVQLVSGGGLVQPGASLRSLSCASGCTFT			WYRQPGGLEWV	EINP	RNDRTNNEKFT	RTTISDSSRTLYLONHSLAREDTAVYTCAL			GGGVAN	DN	1

Figura 9

a)

scFv de L1_9.3

DIQMTQTTSSLSAFLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI
SNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKR**TSGPGDGGKGGPGKGPGGEGTKGTGPGGQVQLQQPG**AELVKS
GASVNLSC**R**ASGYTFTRYWMLWVRQRP**G**HGLEW**VGE**INPRNDRTNYNEKF**K**TKATLT**VDR**SS**TAY**MQ**L**TS**L**TSE
DSAVYFC**AL**GGGYAMDYWGQGTSLTVSS

b)

L1_9.3Hu

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI
SSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKR**TSGPGDGGKGGPGKGPGGEGTKGTGPGGEVQLVQSGGGLVQS**
GGSLRLSC**R**ASGYTFTRYWMLWVRQRP**G**KGLEW**VAE**INPRNDRTNYNEKF**K**TRFTIS**VDR**SK**NT**LY**LQ**MDSLRAE
DTAVYFC**AL**GGGYAMDYWGQGTSLTVSS

c)

L1_9.3Hu3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI
SSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKR**TSGPGDGGKGGPGKGPGGEGTKGTGPGGEVQLVQSGGGLVQS**
GGSLRLSC**R**ASGYTFTRYWMLWVRQRP**G**KGLEW**VAE**INPRNDRTNYNEKF**K**TRFTIS**VDR**SK**NT**LY**LQ**MDSLRAE
DTAVYFC**AL**GGGYAMDYWGQGTSLTVSS

Figura 10

a)

Anticuerpo de cadena sencilla murino L1-9.3

NdeI
 M K Y L L P T A A A G L L L L A
 1 ACATATGAAA TACCTATTGC CTACGGCAGC CGCTGGATTG TTATTACTCG
 TGTATACTTT ATGGATAACG GATGCCGTCG GCGACCTAAC AATAATGAGC

SfiI
 NcoI
 A Q P A M A D I Q M T Q T T S S
 51 CGGCCCGAGC GGCCATGGCC GATATTGAGA TGACCCAGAC CACGAGCAGC
 GCGGGTTCGG CCGGTACCGG CTATAAGTCT ACTGGGTCGT GTGCTCGTCG
 L S A F L G D R V T I S C R A S Q
 101 CTGAGCGCGT TTCTGGGCGA TCGTGTGACC ATTAGCTGCC GTGCGAGCCA
 GACTCGCGCA AAGACCCGCT AGCACACTGG TAATCGACGG CACGCTCGGT
 D I S N Y L N W Y Q Q K P D G T V
 151 GGATATTAGC AACTATCTGA ACTGGTATCA GCAGAAACCG GATGGCACCG
 CCTATAATCG TTGATAGACT TGACCATAGT CGTCTTTGGC CTACCGTGGC
 K L L I Y Y T S R L H S G V P S
 201 TGAACTGCT GATTATTAT ACCAGCCGTC TGCATAGCGG TGTGCCGAGC
 ACTTTGACGA CTAATAATA TGGTCGGCAG ACGTATCGCC ACACGGCTCG
 R F S G S G S G T D Y S L T I S N
 251 CGTTTITAGC GCAGCGGTAG CCGCACCGAT TATAGCTGGA CCATTTCATA
 GCAAAATGCG CGTCGCCATC GCGGTGGCTA ATATCGGACT GGTAAAGATT
 L E Q E D F A T Y F C Q Q G N T L
 301 CCTGGAACAG GAAGATTITG CGACCTATT TTGCCAGCAG GGCACACCGC
 GGACCTTGTG CTTCTAAAC GCTGGATAAA AACGGTCGTC CCGTTGTGCG
 P W T F G G G T K L E I K R T S
 351 TGCCGTGGAC CTTTGGCGGT GGCACCAAAC TGGAAATTA ACGTACTAGT
 ACGGCACCTG GAACCCGCA CCGTGGTTTG ACCTTTAATT TGCATGATCA
 G F G D G G K G G P G K G P G G E
 401 GGTCCGGGCG ATGGCGGTAA AGGCGGTCCG GGCAAAGGTC CCGGTGGCGA
 CCAGGCCCGC TACCGCCATT TCCGCCAGGC CCGTTTCCAG GCCCAGCGCT

SmaI
 XmaI
 Aval
 PstI
 G T K G T G F G G Q V Q L Q Q P G
 451 AGGCACCAAA GGCCTGGGC CCGGGGGTCA GGTTCAGCTG CAGCAGCCGG
 TCCGTGGTTT CCGTGACCGG GGCCTCCAGT CCAAGTCGAC GTCGTCGGCC
 A E L V K S G A S V N L S C R A
 501 GTGCGGAAT GGTGAAAAGC GCGCGGAGCG TGAACCTGAG CTCCTCTCGG
 CACGCTTGA CCACTTTTGG CCGCGCTCGC ACTTGGACTC GACAGCACCG
 S G Y T F T R Y W M L W V R Q R P
 551 AGCGGCTATA CCTTACCGG TTATTGGATG CTGTGGGTGC GTCAGCGTCC
 TCGCCGATAT GGAATGGGC AATAACCTAC GACACCCAGC CAGTCGCGAG
 G K G L E W V G E I N P R N D R T
 601 GGGCCACGGC CTGGAATGGG TGGGCGAAAT TAATCCGCGT AACGATCGTA
 CCGGTTGCGG GACCTTACCC ACCCGTTTA ATTAGCGGCA TTGCTAGCAT
 N Y N E K F K T K A T L T V D R
 651 CCAACTATAA CGAAAAATTC AAAACCAAAG CGACCTGAC CGTGGATCGT
 GGTGATATT GCTTTTAAAG TTTTGGTTTC GCTGGGACTG GCACCTAGCA
 S S S T A Y M Q L T S L T S E D S
 701 AGCAGCAGCA CCGCGTATAT GCAGCTGACG AGCCTGACCT CTGAAGATAG
 TCGTCGTCGT GCGCATATA CGTCGACTGC TCGGACTGGA GACTTCTATC

BssHII
 A V Y F C A L G G G Y A M D Y W G
 751 CGCGGTGTAT TTCTGCGCGC TGGGCGGTGG CTATGCGATG GATTATTGGG
 GCGCCACATA AAGACGCGCG ACCCGCCACC GATACGCTAC CTAATAACCC

NotI
 Q G T S V T V S S G G A A A A P
 801 GCCAGGGCAC CAGCGTTACC GTGAGCAGCG CCGGTGCGGC CGCTGCACCA
 CGGTCCCGTG GTCGAATGG CACTCGTCGC CGCCAGCGCG GCGACGTGGT
 S V F I F P P S D E Q L K S G T A
 851 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC
 AGACAGAGT AGAAGGGCGG TAGACTACTC GTCACCTTTA GACCTTGACG
 S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
 901 CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC
 GAGACACAC ACGGACGACT TATTGAAGAT AGGGTCTCTC CCGTTTCATG
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V

Figura 10 a) cont.

951 AGTGGAGGTT GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC
 TCACCTTCCA CCTATTGCGG GAGGT7AGCC CATTGAGGGT CCTCTCACAG

```

      T E Q D S K D S T Y S L S S T L T .
1001 ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC
      TGTCTCGTCC TGTCGTTCCCT GTCGTGGATG TCGGAGTCGT CGTGGGACTG
      · L S K A D Y E K H K V Y A C E V T ·
1051 GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA
      CGACTCGTTT CGTCTGATGC TCTTTGTGTT TCAGATGCGG ACGCTTCAGT
      · H Q G L S S P V T K S F N R G E
1101 CCCATCAGGG CCTGAGTTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CCGCGGAGAG
      GGGTAGTCCC GGA CTCAAGC GGGCAGTGTT TCTCGAAGTT GGC GCCTCTC
      S H H H H H H * *
1151 TCACACCACC ACCACCACCA CTAGTAAT
      AGTGTGGTGG TGGTGGTGGT GATCATTA

```

Figura 10

b)

Anticuerpo de cadena sencilla humanizado L1-9.3Hu

```

      NdeI
      M K Y L L P T A A A G L L L L A
1  ACATATGAAA TACCTATTGC CTACGGCAGC CGCTGGATTG TTATTACTCG
   TGTATACTTT ATGGATAACG GATGCCGTCG GCGACCTAAC AATAATGAGC
      SfiI

      NcoI
      A Q P A M A D I Q M T Q S P S S
51 CGGCCAGGCC GGCATGGCC GATATTCAGA TGACCCAGAG CCCGAGCAGC
   GCCGGGTCGG CCGGTACCGG CTATAAGTCT ACTGGGTCTC GGGCTCGTCG
   L S A S V G D R V T I T C R A S Q
101 CTGAGCGCGA GCGTGGGTGA TCGTGTGACC ATTACCTGCC GTGCGAGCCA
   GACTCGCGCT CGCACCCTAGT AGCAGCTGGT TAATGGACGG CACGCTCGGT
   D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P
151 GGATATTAGC AACTATCTGA ACTGGTATCA GCAGAAACCG GCGAAAGCGC
   CCTATAATCG TTGATAGACT TGACCATAGT CGTCTTTGGC CCGTTTCGCG
   K L L I Y Y T S R L H S G V P S
201 CGAAACTGCT GATTTATTAT ACCAGCCGTC TGCATAGCGG TGTGCCGAGC
   GCTTTGACGA CTAATAATAA TGGTCGGCAG ACGTATCGCC ACACGGCTCG
   R F S G S G S G T D Y T F T I S S
251 CGTTTTAGCG GCAGCGGTAG CCGCACCAGT TATACCTTTA CCATTAGCAG
   GCAAAATCGC CGTCGCCATC GCGTGGGCTA ATATGGAAAT GGAATCGTC
      PstI
      L Q P E D F A T Y F C Q Q G N T L
301 CCTGCAGCCG GAAGATTTTG CGACCTATTI TTGCCAGCAG GCGAACACGC
   GGACGTCGGC CTTCTAAAC GCTGGATAAA AACGGTCGTC CCGTTGTGCG
   P W T F G G G T K L E I K R T S
351 TGCCGTGGAC CTTTGGCGGT GGCACCAAAAC TGGAAATTAA ACGTACTAGT
   ACGGCACCTG GAAACCGCCA CCGTGGTTTG ACCTTTAATT TGCATGATCA
   G P G D G G K G G P G K G P G G E
401 GGTCCGGGCG ATGGCGGTAA AGGCGGTCCG GCGAAAGGTC CCGGTGGCGA
   CCAGGCCCGC TACCGCCATT TCCGCCAGGC CCGTTTCCAG GCCCACCGCT
      SmaI
      XmaI
      AvaI
      G T K G T G P G G E V Q L V Q S G
451 AGGCACCAAA GGCAGTGGGC CCGGGGGTGA AGTTCAGCTG GTGCAGAGCG
   TCCGTGGTTT CCGTGACCGG GCGCCCACT TCAAGTCGAC CACGTCTCGC
   G G L V Q S G G S L R L S C R A
501 GCGGTGGTCT GGTTCAGAGC GGTGGCAGCC TGCCTCTGAG CTGTGCTGCG
   CGCCACCAAG CCAAGTCTCG CCACCGTCGG ACGCAGACTC GACAGCACCG
   S G Y T F T R Y W M L W V R Q R P
551 AGCGGCTATA CCTTACCCG TTATTGGATG CTGTGGGTGC GTGAGCGTCC
   TCGCCGATAT GGAAGTGGGC AATAACCTAC GACACCCACG CAGTCGCGAGG
   G H G L E W V G E I N P R N D R T
601 GGGCCACGGC CTGCAATGGG TGGGCGAAAT TAATCCCGGT AACGATCGTA
   CCCGGTGCCG GACCTTACCC ACCCGCTTTA ATTAGGCGCA TTGCTAGCAT
   N Y N E K F K T R F T I S V D R
651 CCAACTATAA CGAAAAATTT AAAACCGGCT TCACCATTAG CGTGGATCGT
   GGTGATATT GCTTTTAAA TTTTGGGCGA AGTGSTAATC GCACCTAGCA
      PstI
      S K S T A Y L Q N D S L R A E D T
701 AGCAAAAGCA CCGCGTATCT GCAGATGGAT AGCCTGCGTG CGGAAGATAC
   TCGTTTTCTG GCGCATAGA CGTCTACCTA TCGGACGCAC GCCTTCTATG
      BssHII
      A V Y F C A L G G G Y A M D Y W G
751 CGCGGTGTAT TTTTGGCGC TGGCGGTGG CTATGCGATG GATTATTGGG
   GCGCCACATA AAAACGCGC ACCCGCCACC GATACGCTAC CTAATAACCC
      NotI
      Q G T L V T V S S G G A A A P
801 GCCAGGCGAC CCTGTTTACC GTGAGCAGCG GCGGTGCGGC CGCTGCACCA
   CGGTCCCGTG GGACCAATGG CACTCGTCGC GCGCACGCC GCGACGTGGT
   S V F I F P P S D E Q L K S G T A
851 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACCTG

```

Figura 10 b) cont.

```

AGACAGAAGT AGAAGGGCGG TAGACTACTC GTCAACTTTA GACCTTGACG
S V V C L L N N F Y P R E A K V Q

```

```

901 CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC
    GAGACAACAC ACGGACGACT TATTGAAGAT AGGGTCTCTC CGGTTTCATG
    · W K V D N A L Q S G N S Q E S V
951 AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACGCCA GGAGAGTGTC
    TCACCTTCCA CCTATTGCGG GAGGTTAGCC CATTGAGGGT CCTCTCACAG
    T E Q D S K D S T Y S L S S T L T ·
1001 ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC
    TGTCTCGTCC TGTCGTTCCCT GTCGTGGATG TCGGAGTCGT CGTGGGACTG
    · L S K A D Y E K H K V Y A C E V T ·
1051 GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA
    CGACTCGTTT CGTCTGATGC TCTTTGTGTT TCAGATGCGG ACGCTTCAGT
    · H Q G L S S P V T K S F N R G E
1101 CCCATCAGGG CCTGAGTTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CCGCGGAGAG
    GGGTAGTCCC GGAACAAGC GGGCAGTGTT TCTCGAAGTT GGCGCCTCTC
    S H H H H H H * *
1151 TCACACCACC ACCACCACCA CTAGTAATT
    AGTGTGGTGG TGGTGGTGGT GATCATTAA

```

Figura 10

c)

Anticuerpo de cadena sencilla humanizado L1-9.3Hu3

```

      NdeI
      M K Y L L P T A A A G L L L L A
1 ACATATGAAA TACCTATTGC CTACGGCAGC CGCTGGATTG TTATTACTCG
  TGTATACTTT ATGGATAACG GATGCCGTCG GCGACCTAAC AATAATGAGC
      SfiI
      A Q P A M A D I Q M T Q S P S S
51 CGGCCAGGCC GGCCATGGCC GATATTGAGA TGACCCAGAG CCCGAGCAGC
  GCCGGGTGCG CCGGTACCGG CTATAAGTCT ACTGGGTCTC GGGCTCGTCG
  L S A S V G D R V T I T C R A S Q
101 CTGAGCGCGA GCGTGGGTGA TCGTGTGACC ATTACCTGCC GTGCGAGCCA
  GACTCGCGCT CGCACCCACT AGCACACTGG TAATGGACGG CACGCTCGGT
  D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P
151 GGATATTAGC AACTATCTGA ACTGGTATCA GCAGAAACCG GGCAAAAGCGC
  CCTATAATCG TTGATAGACT TGACCATAGT CGTCTTTGGC CCGTTTGGCG
  K L L I Y Y T S R L H S G V P S
201 CGAACTGCT GATTATTAT ACCAGCCGTC TGACATAGCG TGTCGCCGAGC
  GCTTTGACGA CTAAATAATA TGGTCGGCAG ACGTATCGCC ACACGGCTCG
  R F S G S G S G T D Y T L T I S S
251 CGTTTTCGCG GCAGCGGTAG CGGCACCGAT TATACCTGA CCATTAGCAG
  GCAAAATCGC CGTCGCCATC GCGGTGGCTA ATATGGGACT GSTAATCGTC
      PstI
      L Q P E D F A T Y F C Q Q G N T L
301 CCTGCAGCCG GAAGATTTTG CGACCTATTT TTGCCAGCAG GGCAACACCG
  GGACGTGCGC CTTCTAAAAC GCTGGATAAA AACGGTCGTC CCGTTGTGCG
  P W T F G G G T K L E I K R T S
351 TGCCGTGGAC CTTTGGCGGT GGCACCAAAC TGGAAATTA ACCTACTAGT
  ACGGCACCTG GAAACCGCCA CCGTGGTTTG ACCTTAATT TGATGATCA
  G P G D G G K G G P G K G P G G E
401 GGTCCGGGCG ATGGCGGTAA AGGCGGTCCG GGCAAAAGGC CCGGTGGCGA
  CCAGGCCGCG TACCGCCATT TCCGCCAGGC CCGTTTCAG GCCCACCGCT
      SmaI
      XmaI
      AuaI
      G T K G T G P G G E V Q L V Q S G
451 AGGCACCAAA GGCCTGGGC CCGGGGGTGA AGTTCAGCTG GTGCAGAGCG
  TCCGTGGTTT CCGTGACCGG GGCCCCCACT TCAAGTCGAC CACGTCTCGC
  G G L V Q S G G S L R L S C R A
501 GCGGTGGTCT GGTTCAGAGC GGTGGCAGCC TGGCTCTGAG CTGTCGTGCG
  CGCCACCAAG CCAAGTCTCG CCACCGTCGG ACGCAGACTC GACAGCAGCG
  S G Y T F T R Y W M L W V R Q R P
551 AGCGGCTATA CCTTACCGG TTATTGGATG CTGTGGGTGC GTGACGCTCC
  TCGCCGATAT GGAATGGGC AATAACCTAC GACACCCACG CAGTCGCAGG
  G K G L E W V A E I N P R N D R T
601 GGTAAGGCG CTGGAATGGG TGGCGGAAAT TAATCCGCGT AACGATCGTA
  CCCATTTCG GACCTTACCC ACCGCTTTA ATTAGGCGCA TTGCTAGCAT
  N Y N E K F K T R F T I S V D R
651 CCAACTATAA CGAAAAATTT AAAACCCGCT TCACCATTAG CGTGGATCGT
  GGTTGATATT GCITTTTAAA TTTTGGGCGA AGTGGTAATC GCACCTAGCA
      PstI
      S K N T L Y L Q M D S L R A E D T
701 AGCAAAACA CCCTGTATCT GCAGATGGAT AGCCTGCGTG CGGAAGATAC
  TCGTTTTTGT GGGACATAGA CGTCTACCTA TCGGACGCAC GCCTTCTATG
      BssHII
      A V Y F C A L G G G Y A M D Y W G
751 CGCGGTGTAT TTTTGGCGCG TGGCGGTGG CTATCGCATG GATTATTGGG
  GCGCCACATA AAAACGCGCG ACCCGCCACC GATACGCTAC CTAATAACCC
      NotI
      Q G T L V T V S S G G A A A P
801 GCCAGGSCAC CCTGGTTACC GTGAGCAGCG GCGGTGCGGC CGCTGCACCA

```

Figura 10 c) cont.

```

CGGTCCCGTG GGACCAATGG CACTCGTCGC CGCCACGCG GCGACGTGGT
S V F I F P P S D E Q L K S G T A

```

```

851 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC
    AGACAGAAGT AGAAGGGCGG TAGACTACTC GTCAACTTTA GACCTTGACG
    · S V V C L L N N F Y P R E A K V Q ·
901 CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC
    GAGACAACAC ACGGACGACT TATTGAAGAT AGGGTCTCTC CGGTTTCATG
    · W K V D N A L Q S G N S Q E S V
951 AGTGGAAGGT GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACGCCA GGAGAGTGTC
    TCACCTTCCA CCTATTGCGG GAGGTTAGCC CATTGAGGGT CCTCTCACAG
    T E Q D S K D S T Y S L S S T L T ·
1001 ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC
    TGTCTCGTCC TGTCGTTCTT GTCGTGGATG TCGGAGTCGT CGTGGGACTG
    · L S K A D Y E K H K V Y A C E V T ·
1051 GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA
    CGACTCGTTT CGTCTGATGC TCTTTGTGTT TCAGATGCGG ACGCTTCAGT
    · H Q G L S S P V T K S F N R G E
1101 CCCATCAGGG CCTGAGTTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CCGCGGAGAG
    GGGTAGTCCC GGAACAAGC GGGCAGTGTT TCTCGAAGTT GGGCCTCTC
    S H H H H H H * *
1151 TCACACCACC ACCACCACCA CTAGTAATT
    AGTGTGGTGG TGGTGGTGGT GATCATTAA

```

Figura 11

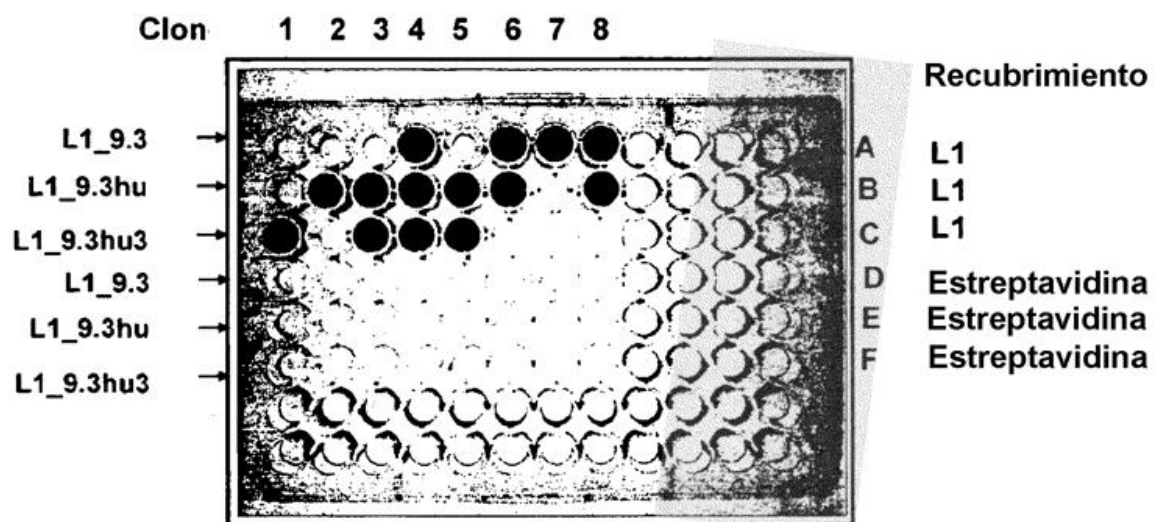


Figura 12

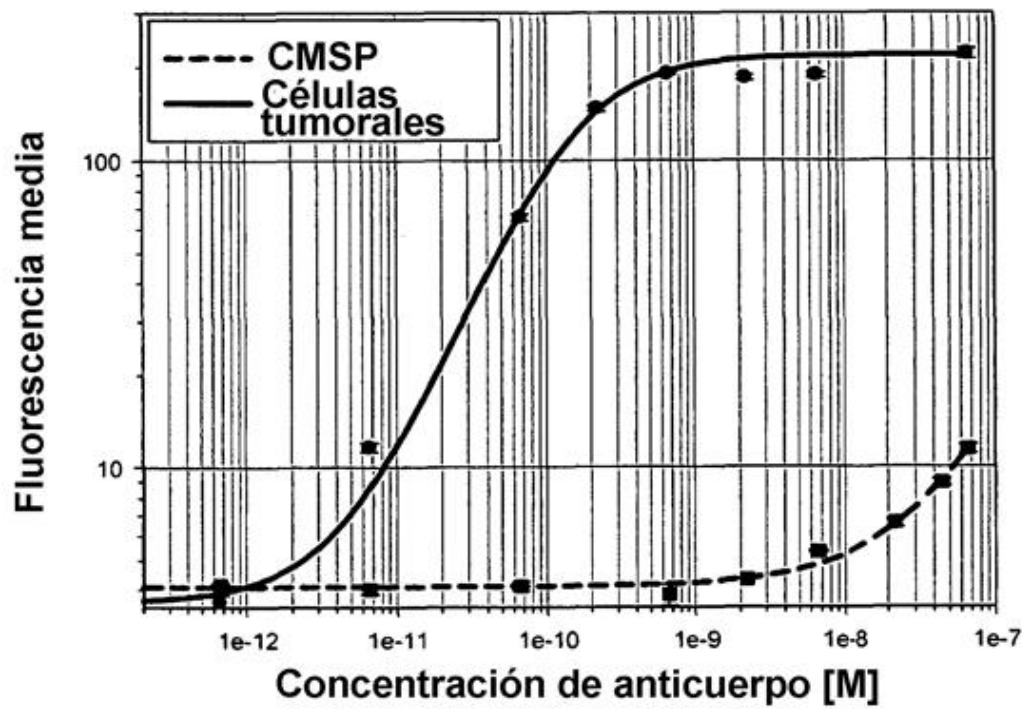
a)

GAAGAGTTAGCCTTGCAGCTGTGCTCAGCCCTAAATAGTTCCCAAAAATTTGCATGCTCTCACTTC
 CTATCTTTGGGTACTTTTTCATATACCAGTCAGATTGTGAGCCATTGTAATTGAAGTCAAGACTCA
 GCCTGGACATGATGTCCTCTGCTCAGTTCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTCTTCAAGGTAAAAGT
 TACTACAATGGGAATTTTGTGTTGCACAGTGATTCTTGTGACTGGAATTTTGGAGGGGTCTTT
 CTTTTCTGCTTAACTCTGTGGGTATTTATTGTGTCTCCACTCCTAGGTACCAGATGTGATATCCA
 GATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTTTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAG
 GGCAAGTCAGGACATTAGCAATTAATTTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAA
 CTCCTTATCTATTACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT
 CTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATTTTGCCACTTACTTTTGC
CAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACATTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTAAA
 TAGAATCCAAAGTCTCTTTCTTCCGTTGTCTATGTCTGTGGCTTCTATGTCTACAAATGATGTAT

b)

TTCAGCATCCTGATTCTGACCCAGGTGTCCCTTCTTCTCCAGCAGGAGTAGGTGCTCATCTAAT
 ATGTATCCTGCTCATGAATATGCAAATCCTCTGAATCTACATGGTAAATGTAGGTTTGTCTATATCA
 CACACAGAAAAACATGAGATCACAGTTCTCTCTACAGTTACTGAACACACAGGACCTCACCATGG
 GATGGAGCTATATCATCCTCTTTTTGGTAGCAACAGCTACAGGTAAGGGGCTCACAGTAGAAGG
 CTTGAGGTCTGGCCATATACATGGGTGACAGTGACATCCACTTTGCCTTTCTTCCACAGATGTC
 CACTCCCAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGTCTGGGGCTTCAGTGAAC
 CTGTCCTGCAGGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGATACTGGATGCTCTGGGTGAGGCAGAGG
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGGTGGAGAGATTAACTCTCGCAACGATCGTACTAATTACAATG
 AGAAATTCAAGACCAAGGCCACACTGACTGTAGACCGATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAAC
 TCACCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCCCTGGGGGGGGGCTATGCTAT
GGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGGTCT
 TAATTTTAAACCTTTGTTATGGAGTTTTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATTTGTCCCTGAG
 GGAGCCGGCTGAGAGAAGTTGGGAAATAAACTGTCTAGGGATCTCAGAGCCTTTAGGACAGATT
 A

Figura 13



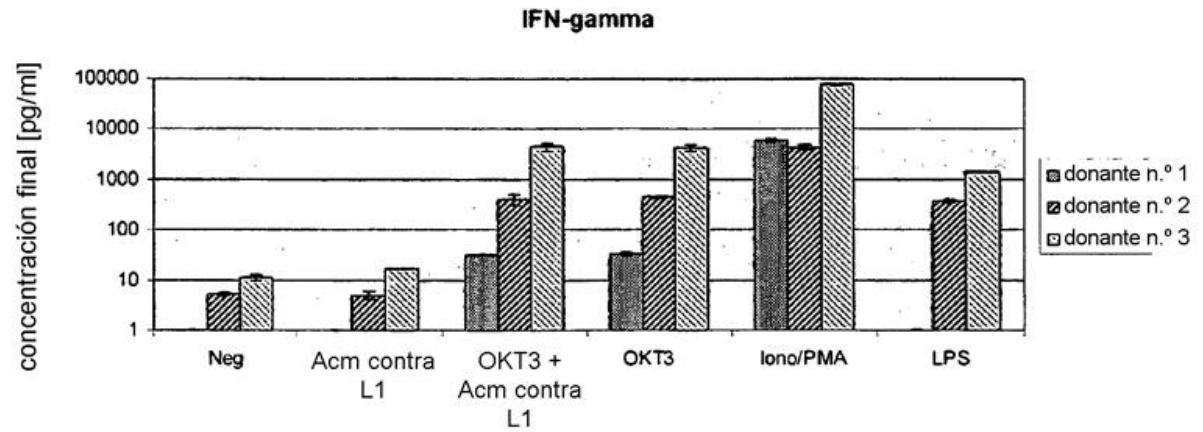
A)

B)

	K_D [M]
Células tumorales	1×10^{-10}
CMSP (estimado)	$>4 \times 10^{-8}$

Figura 14

A)



B)

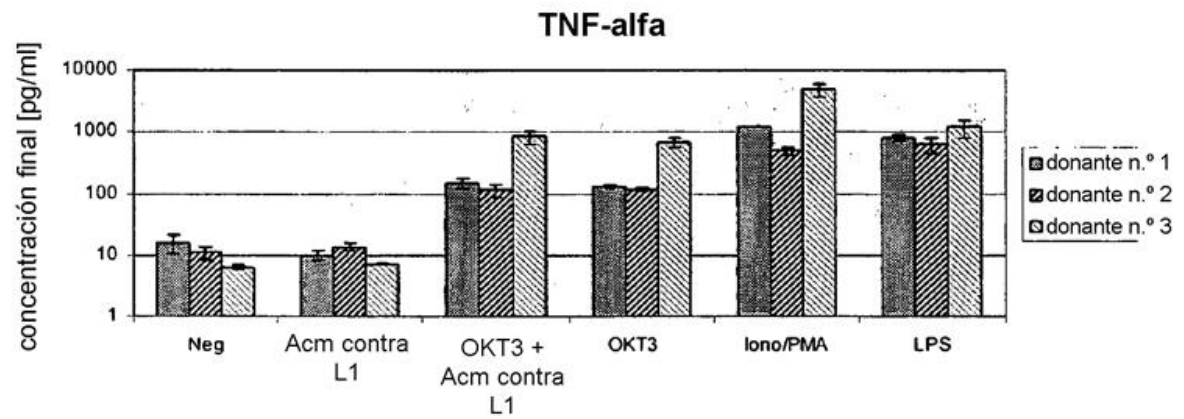


Figura 15

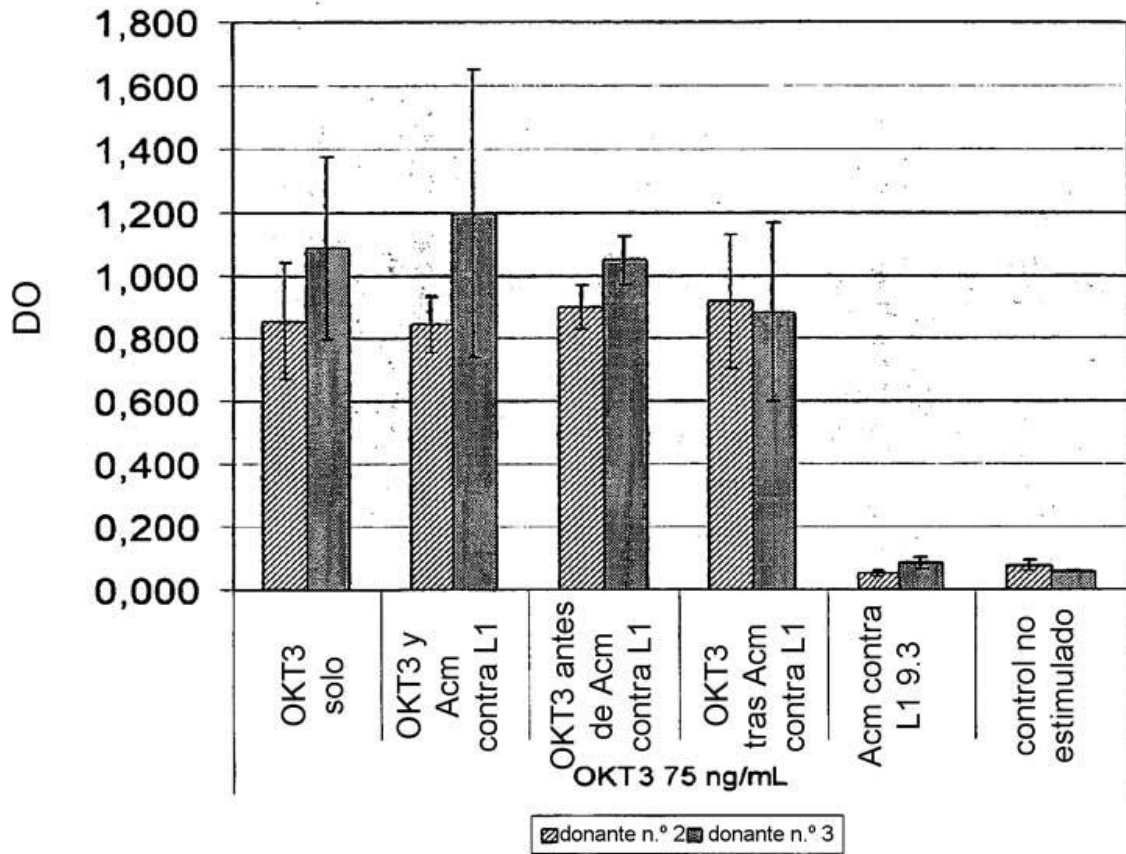


Figura 16

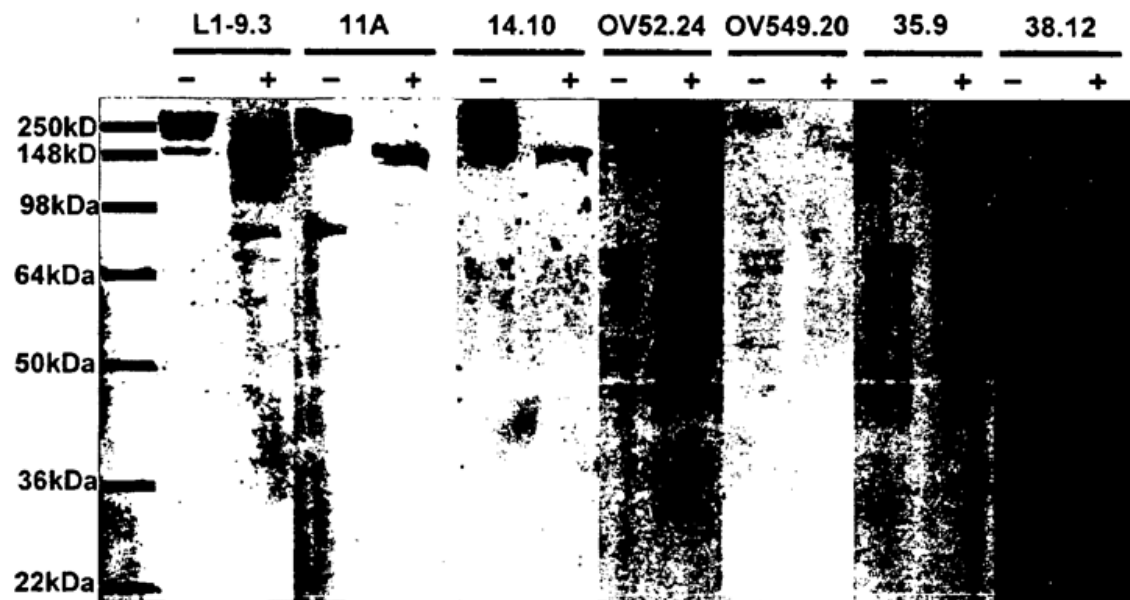


Figura 17

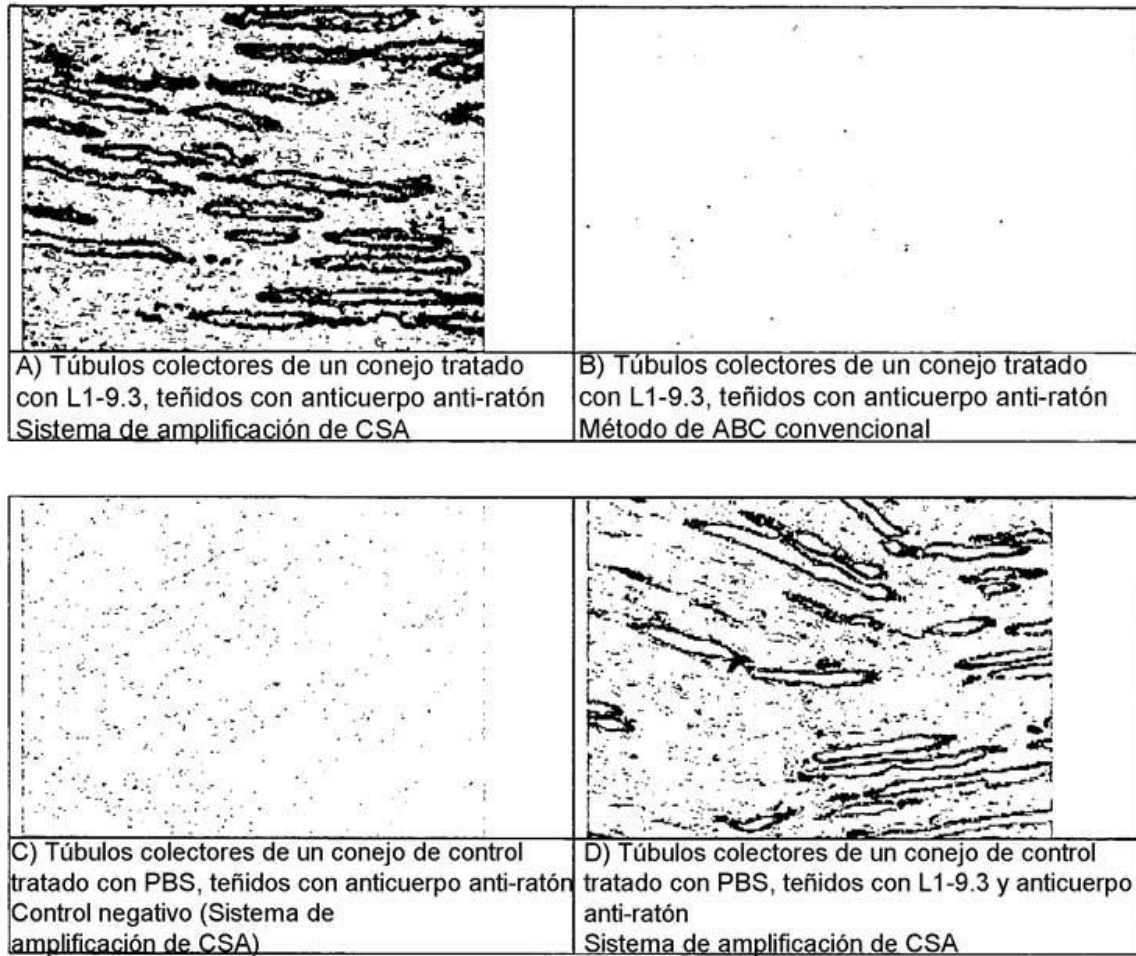
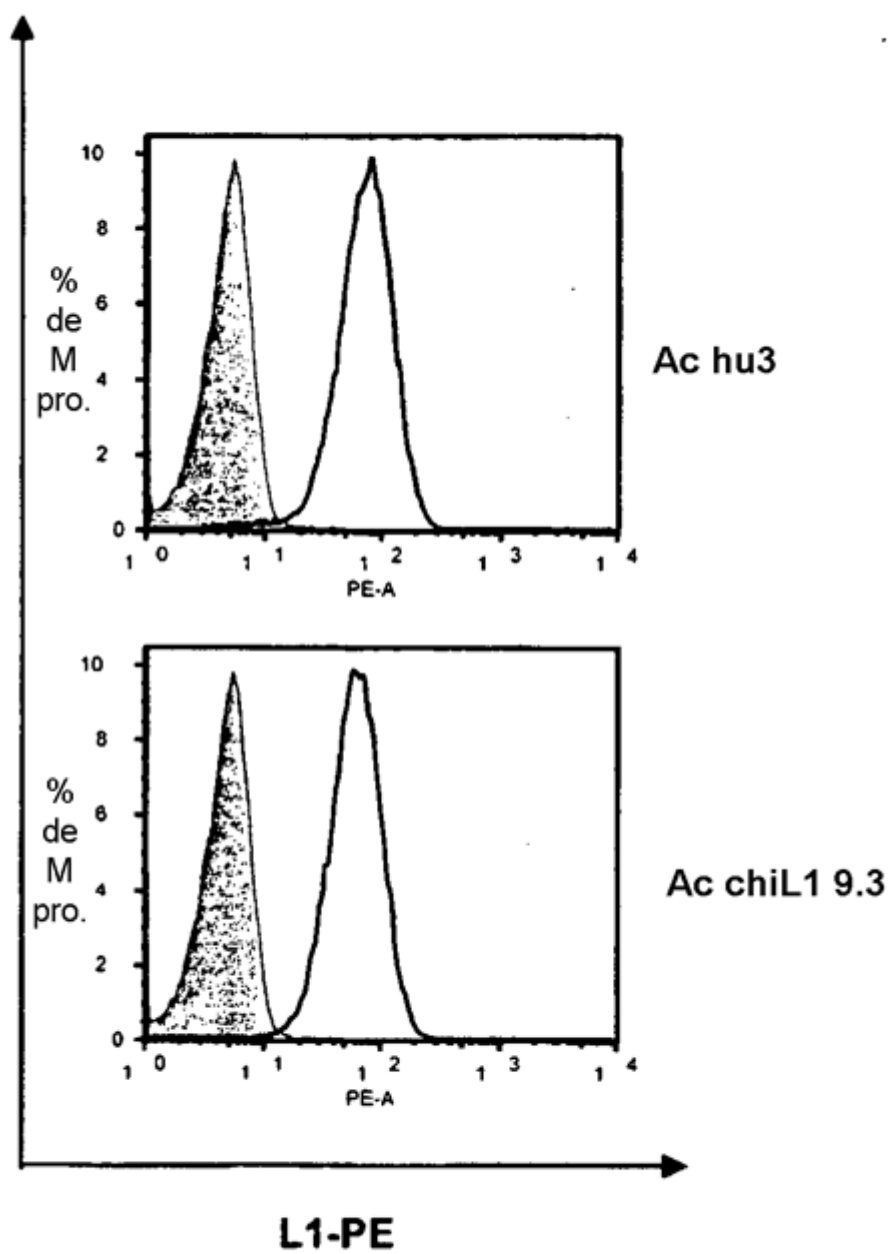


Figura 18



SKOV3ip con pcDNA3.1-luciferasa

Figura 19

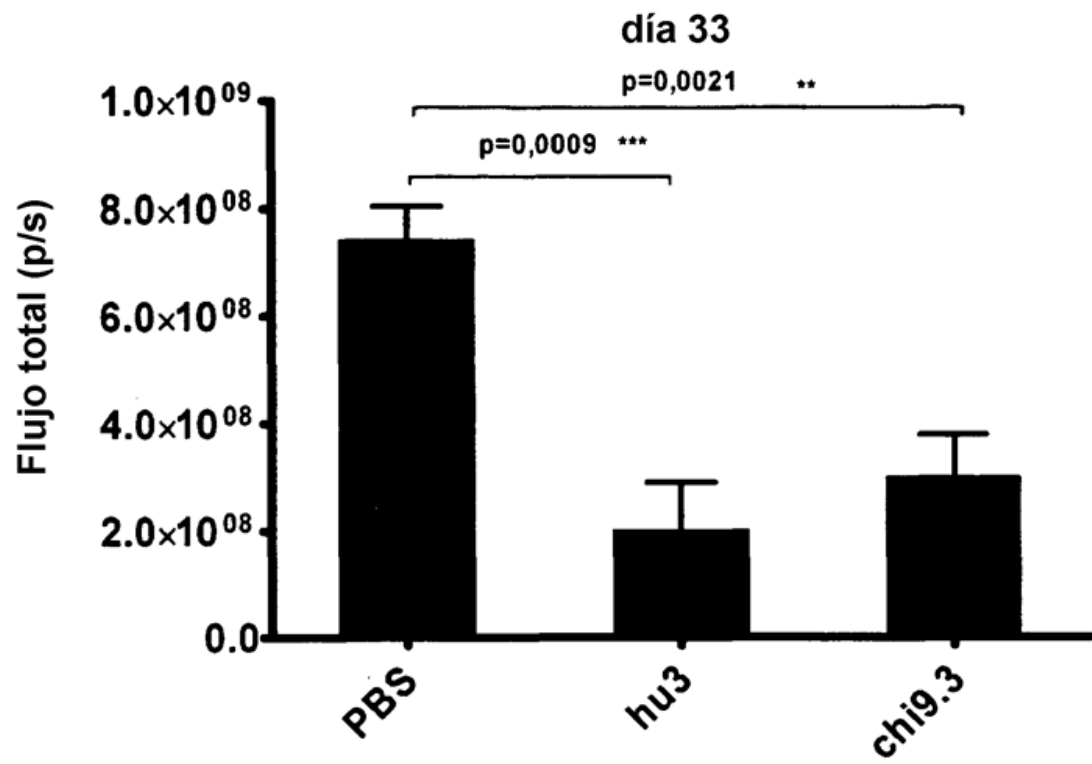


Figura 20

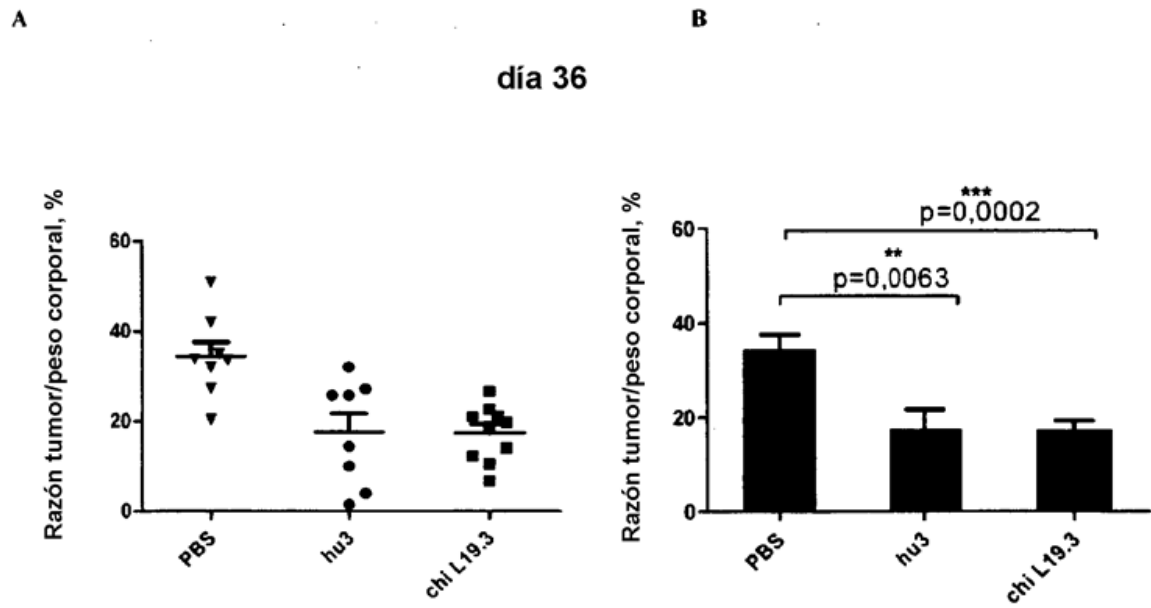


Figura 21 A

Actividad caspasa-3/-7:
en células PT45res tras estimulación con gemcitabina y anticuerpo L1-9.3

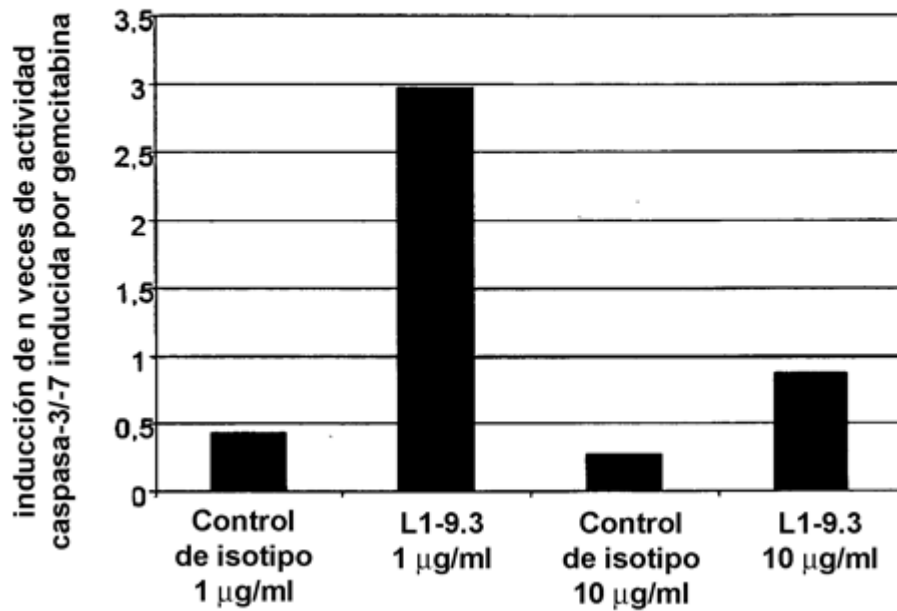


Figura 21 B

Actividad caspasa-3/-7:
en células PT45res tras estimulación con etopósido y anticuerpo L1-9.3

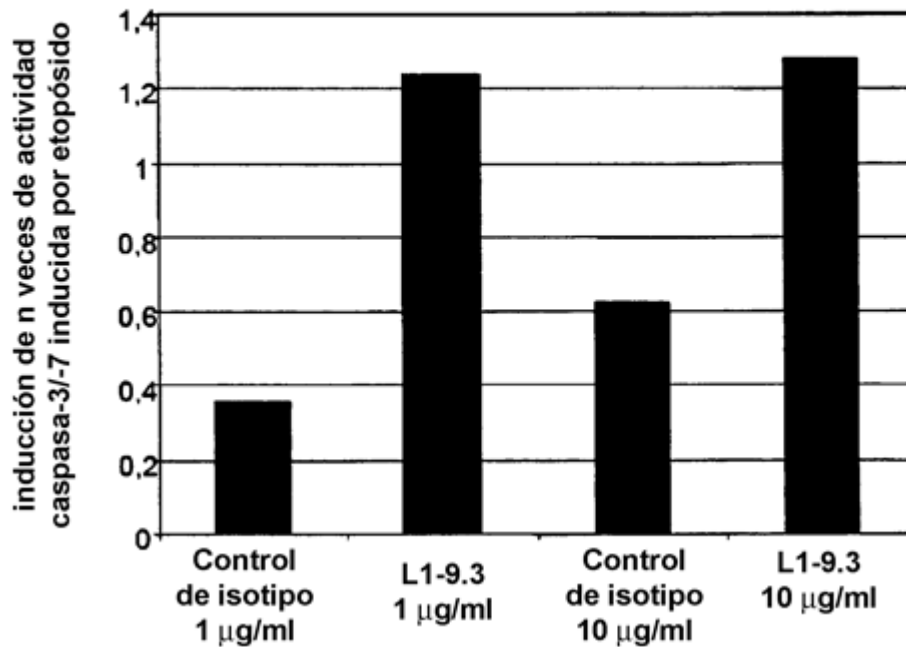


Figura 22 A

Actividad caspasa-3/-7:
en células Colo357 tras estimulación con gemcitabina y anticuerpo L1-9.3

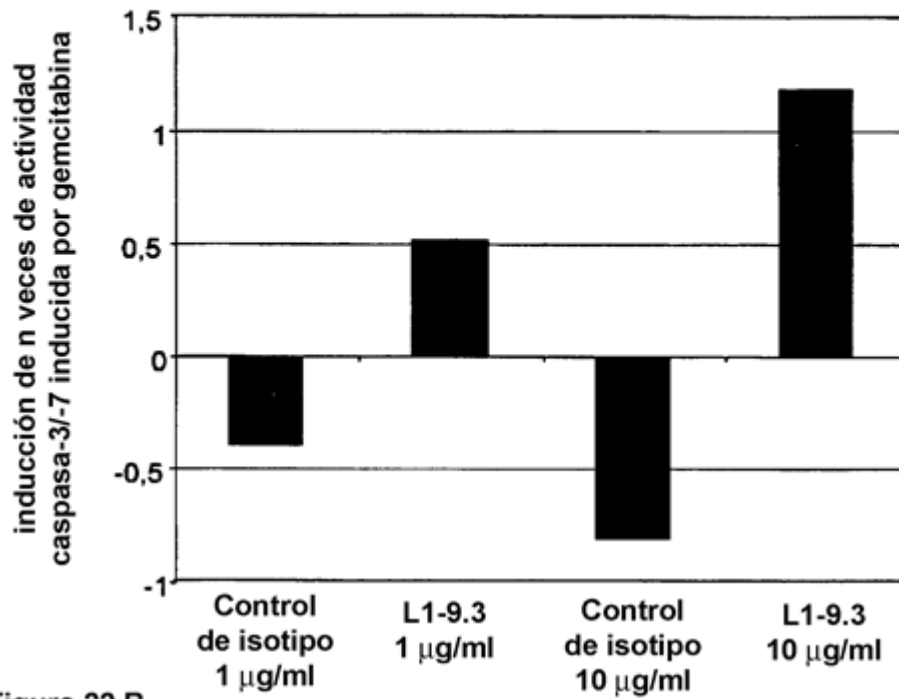


Figura 22 B

Actividad caspasa-3/-7:
en células Colo357 tras estimulación con etopósido y anticuerpo L1-9.3

