

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 264**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2011 PCT/US2011/063612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO2012078688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2011 E 11847198 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2648752**

54 Título: **Anticuerpos humanizados frente a LIV-1 y el uso de los mismos para tratar el cáncer**

30 Prioridad:

06.12.2010 US 420291 P

25.02.2011 US 201161446990 P

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

28.06.2017

73 Titular/es:

SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)

21823 30th Drive, S.E.

Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

SMITH, MARIA LEIA;

SUSSMAN, DJANGO;

ARTHUR, WILLIAM y

NESTEROVA, ALBINA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 620 264 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados frente a LIV-1 y el uso de los mismos para tratar el cáncer

Antecedentes

5 El LIV-1 es un miembro de la subfamilia LZT (transportadores de cinc LIV-1 de tipo ZIP) de proteínas transportadoras de cinc. Taylor et al., *Biochim Biophys. Acta* 1611: 16-30 (2003). El análisis informático de la proteína LIV-1 revela un posible motivo de metaloproteasa, que se ajusta a la secuencia consenso del motivo del sitio catalítico de fijación a cinc de la metaloproteasa de cinc. El ARNm de LIV-1 se expresa principalmente en tejidos de mama, próstata, hipófisis y cerebro.

10 La proteína LIV-1 también está implicada en determinadas afecciones cancerosas, p. ej., cáncer de mama y cáncer de próstata. La detección de LIV-1 está asociada al cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos, McClelland et al., *Br. J. Cancer* 77: 1653-1656 (1998), y la diseminación metastásica de estos cánceres a los ganglios linfáticos regionales. Manning et al., *Eur. J. Cancer* 30A: 675-678 (1994). En la solicitud de patente internacional WO 2004/067564 se describen los anticuerpos anti-LIV-1 de ratón producidos en hibridomas (ATCC-5705, ATCC-5706 y ATCC-5707).

15 Compendio de la invención reivindicada

La invención da a conocer un anticuerpo humanizado, en donde la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en SEQ ID n.º 52 o 53, y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en SEQ ID n.º 59 o 60.

20 La descripción también da a conocer un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos idéntica al 90% a la SEQ ID n.º 53 siempre y cuando la posición H27 esté ocupada por L, la posición H29 esté ocupada por I, H30 por E y H94 por V, y la región variable de la cadena ligera madura al menos idéntica al 90% a la SEQ ID n.º 60 siempre y cuando la posición L36 esté ocupada por Y y la posición L46 por P. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprende tres CDR de SEQ ID n.º 53 y tres CDR de SEQ ID n.º 60. Las CDR se muestran en la figura 16. Opcionalmente, la posición H76 está ocupada por N. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos al 95% a la SEQ ID n.º 53, y una región variable de la cadena ligera madura idéntica al menos al 95% a la SEQ ID n.º 60. Opcionalmente, la región variable de la cadena pesada madura está fusionada a una región constante de cadena pesada y la región constante de la cadena ligera madura está fusionada a una región constante de cadena ligera. Opcionalmente, la región constante de la cadena pesada es una forma mutante de la región constante natural de humano que tiene una fijación reducida a un receptor de Fcγ con respecto a la región constante natural de humano. Opcionalmente, la región constante de la cadena pesada es del isotipo IgG1. Opcionalmente, la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 44 y la región constante de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 42. Opcionalmente, la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 46 (S239C) y la región constante de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 42. En algunos de tales anticuerpos humanizados, cualquier diferencia en las CDR de la región variable de la cadena pesada madura y de la región variable de la cadena ligera madura de las SEQ ID n.º 52 y 60, respectivamente, residen en las posiciones H60 a H65. En algunos de tales anticuerpos humanizados, la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID n.º 52 o 53, y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID n.º 59 o 60. En algunos de tales anticuerpos humanizados, la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID n.º 53 y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en la SEQ ID n.º 60. Algunos de tales anticuerpos humanizados están conjugados a un agente citotóxico o citostático. Algunos de tales anticuerpos humanizados tienen una constante de asociación para el LIV-1 de humano o de macaco cangrejero de $0,5 \text{ a } 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

50 La descripción también da a conocer un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada madura que comprende las tres CDR de Kabat de SEQ ID n.º 52, en donde la posición H27 está ocupada por L, la posición H29 está ocupada por I, H30 por E, H76 por N y H94 por V, y la región variable de la cadena ligera madura que comprende las tres CDR de Kabat de SEQ ID n.º 60 siempre y cuando la posición L36 esté ocupada por Y y la posición L46 por P. La invención también da a conocer uno o varios ácidos nucleicos que codifican una región variable de la cadena pesada madura y una región variable de la cadena ligera madura de cualquiera de los anticuerpos humanizados definidos más arriba.

55 La invención da a conocer adicionalmente un anticuerpo humanizado de la invención para ser usado para el tratamiento de un paciente que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer. El cáncer puede ser, por ejemplo, un cáncer de mama, un cáncer de cuello uterino, melanoma o un cáncer de próstata.

La invención da a conocer adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado tal y como se define más arriba.

También se describen métodos para tratar a un sujeto afectado con un melanoma que expresa la proteína LIV-1 mediante la administración al sujeto de un anticuerpo específico contra LIV-1 o de un conjugado de un fármaco con el anticuerpo contra LIV-1, en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de las células cancerosas del melanoma.

- 5 También se describen métodos para tratar a un sujeto afectado con un cáncer de cuello uterino que expresa la proteína LIV-1 mediante la administración al sujeto de un anticuerpo específico contra LIV-1 o de un conjugado de un fármaco con el anticuerpo contra LIV-1, en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de las células cancerosas del cuello uterino.

10 También se describe en la presente memoria un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos al 90% a HB (SEQ ID n.º 10) y una región variable de la cadena ligera madura idéntica al menos al 90% a LB (SEQ ID n.º 15). Opcionalmente, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos al 95% a HB y una región variable de la cadena ligera madura idéntica al menos al 95% a LB.

15 Opcionalmente, en cualquiera de tales anticuerpos, las posiciones H29, H30 y H76 están ocupadas por I, E y N, y L36 está ocupada por Y. Opcionalmente, cualquier diferencia en las secuencias flanqueantes de la región variable de la región variable de la cadena pesada madura y la SEQ ID n.º 10 se selecciona o seleccionan del grupo que consiste en H27 ocupada por F, H28 ocupada por N, H48 ocupada por I, H66 ocupada por K, H67 ocupada por A, H71 ocupada por A, H76 ocupada por N, H93 ocupada por N, H94 ocupada por V, L37 ocupada por L, L39 ocupada por K, L45 ocupada por K y L46 ocupada por L. Opcionalmente, las tres CDR de la región variable de la cadena pesada madura son las de la SEQ ID n.º 10 y las 3 CDR de la región variable de la cadena ligera madura son las de la SEQ ID n.º 15. Las CDR se muestran en la figura 1. Opcionalmente, la región variable de la cadena pesada madura está fusionada a una región constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera madura está fusionada a una región constante de la cadena ligera. Opcionalmente, la región constante de la cadena pesada es una forma mutante de la región constante natural de humano que tiene una fijación reducida a un receptor de Fcγ con respecto a la región constante natural de humano. Opcionalmente, la región constante de la cadena pesada es del isotipo IgG1. Opcionalmente, la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 6 y la región constante de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 4. Opcionalmente, la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 8 (S239C) y la región constante de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 4. Opcionalmente, cualquier diferencia en las CDR de la región variable de la cadena pesada madura y de la región variable de la cadena ligera madura de SEQ ID n.º 10 y 15, respectivamente, residen en las posiciones H60 a H65. Opcionalmente, la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 10 y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 15. Opcionalmente, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico o citostático. Se prefieren los anticuerpos humanizados que tienen una mayor afinidad por el LIV-1 que el anticuerpo BR2-14a. En otra realización, el anticuerpo humanizado tiene una constante de asociación por el LIV-1 de humano o de macaco cangrejero de $0,5 \text{ a } 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

20 También se describe un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la cadena pesada madura que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 10 y en donde las posiciones H29, H30 y H76 están ocupadas por I, E y N, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera madura que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 15 y en donde la posición L36 está ocupada por Y.

También se describe un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada madura y/o una región variable de la cadena ligera madura de cualquiera de los anticuerpos humanizados descritos más arriba.

25 También se describe un método para tratar a un paciente que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer, que comprende administrar al paciente un tratamiento eficaz de un anticuerpo humanizado tal y como está descrito más arriba. Opcionalmente, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, melanoma o un cáncer de próstata.

También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado tal y como está descrito más arriba.

30 También se describe un método para tratar a una paciente que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer de mama triple negativo, que comprende administrar a la paciente un tratamiento eficaz de un anticuerpo que se fija específicamente al LIV-1. Opcionalmente, en tales métodos, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico o citostático.

Breve descripción breve de las figuras

35 En la figura 1 se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos del Acm murino original contra LIV-1 (denominado BR2-14a) con las regiones variables humanizadas de las cadenas pesada (dos paneles superiores) y ligera (dos paneles inferiores).

En la figura 2 se muestran las curvas de fijación de los Acm humanizados contra LIV-1 y el anticuerpo murino original (denominado BR2-14a).

En la figura 3 se muestran los resultados de los estudios de fijación competitiva de los Acm humanizados contra LIV-1 y el anticuerpo murino original (denominado BR2-14a). Los números entre paréntesis después de cada variante indican el número de retromutaciones.

5 En la figura 4 se muestran los resultados de los estudios de fijación a saturación sobre las células MCF7. BR2-14a-AF se refiere al anticuerpo murino original marcado con AF. hLIV-14 hace referencia a un anticuerpo HBLB marcado con AF, un anticuerpo humanizado que se fija específicamente al LIV-1.

10 En la figura 5 se muestran los resultados de los estudios de fijación competitiva sobre células CHO que expresan la proteína LIV-1 recombinante. BR2-14a hace referencia al anticuerpo murino original. hLIV-14 HBLB WT hace referencia al anticuerpo HBLB. hLIV-14 HBLB S239C hace referencia al anticuerpo HBLB que tiene sustituciones de serina por cisteína en cada posición de la cadena pesada.

En la figura 6 se muestra un análisis de la expresión de la proteína LIV-1 por IHQ en las muestras de pacientes con cáncer de mama tras el tratamiento hormonal.

En la figura 7 se muestra un análisis de la expresión de la proteína LIV-1 por IHQ en las muestras de pacientes con cáncer de próstata metastásico insensible a las hormonas.

15 En la figura 8 se muestra un análisis de la expresión de la proteína LIV-1 por IHQ en las muestras de pacientes con cáncer de mama triple negativo.

20 En la figura 9 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad con los conjugados del anticuerpo contra hLIV-14 con un fármaco, a saber, el Acm HBLB conjugado a vcMMAE (1006) o a mcMMAF (1269), así como los conjugados de los anticuerpos de control murinos (mIgG) y humanos (hIgG). hLIV-14-SEA-1006 hace referencia a una forma no fucosilada del Acm HBLB conjugado a vcMMAE (1006).

25 En la figura 10 se muestran los resultados de un ensayo de ADCC *in vitro* con células MCF7 con el uso de linfocitos citolíticos naturales de humano (donante 1; V/V). hLIV-14 WT hace referencia al Acm HBLB. hLIV-14 SEA hace referencia a la forma sin fucosilar del Acm HBLB. hLIV-14 mcMMAF hace referencia a un conjugado de anticuerpo con fármaco del Acm HBLB conjugado a mcMMAF. hLIV-14 vcMMAE hace referencia a un conjugado de anticuerpo con fármaco del Acm HBLB conjugado a vcMMAE. hLIV-14 SEA vcMMAE hace referencia a una forma sin fucosilar del conjugado anticuerpo-fármaco del Acm HBLB a vcMMAE.

30 En la figura 11 se muestran los resultados de un ensayo de ADCC *in vitro* con células MCF7 con el uso de linfocitos citolíticos naturales de humano (donante 2). hLIV-14 WT hace referencia al Acm HBLB. hLIV-14 SEA hace referencia a la forma sin fucosilar del Acm HBLB. cLIV-14 SEA hace referencia a la forma sin fucosilar del anticuerpo murino original quimérico. hLIV-14 mcF(4) hace referencia a un conjugado de anticuerpo con fármaco del Acm HBLB a una media de 4 moléculas conectoras del fármaco mcMMAF por anticuerpo. hLIV-14 vcE(4) hace referencia a un conjugado de anticuerpo con fármaco del Acm HBLB a una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. hLIV-14 vcE(4) SEA hace referencia a una forma sin fucosilar del conjugado anticuerpo-fármaco Acm HBLB-vcMMAE que tiene una media de cuatro moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. hIgG hace referencia a la IgG de humano de control. H00-mcF(4) hace referencia a un conjugado de anticuerpo de control con fármaco de un anticuerpo no fijante con una media de 4 moléculas conectoras del fármaco mcMMAF por anticuerpo. H00-vcE (4) hace referencia a un conjugado de anticuerpo de control con fármaco de un anticuerpo no fijante con una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo.

35 En la figura 12 se muestran los resultados de un estudio de xenotrasplante de la línea de cáncer de mama MCF7 en ratones atímicos. cLIV-14-mcMMAF(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo de la forma quimérica del anticuerpo murino original que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco mcMMAF por anticuerpo. cLIV-14-vcMMAE(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo de la forma quimérica del anticuerpo murino original que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. H00-mcMMAF(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo de un anticuerpo de control no fijante que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco mcMMAF por anticuerpo. H00-vcMMAE (4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo de un anticuerpo de control no fijante que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. La dosis y el momento de administración están indicados en la figura.

40 En la figura 13 se muestran los resultados de un estudio de xenotrasplante de la línea de cáncer de próstata PC3 en ratones macho atímicos. cLIV-14-vcMMAE (4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo de la forma quimérica del anticuerpo murino original que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. hBU12-vcMMAE(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo de un anticuerpo anti-CD19 que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. La dosis y el momento de la administración están indicados en la figura.

45 En la figura 14 se muestran los resultados de un estudio de xenotrasplante de la línea de cáncer de mama MCF7 en ratones atímicos. hLIV-14-vcMMAE(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. hLIV-14d-vcMMAE(2) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene una media de 2 moléculas conectoras

del fármaco vcMMAE por anticuerpo, cada uno conjugado en la posición S239C de cada cadena pesada. H00-vcMMAE(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo de un anticuerpo de control no fijante que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. La dosis y el momento de administración están indicados en la figura.

- 5 En la figura 15 se muestran los resultados de un estudio de xenoinjerto de la línea de cáncer de próstata PC3 en ratones macho atímicos. hLIV-14-vcMMAE(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. hLIV-14-mcMMAF(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco mcMMAF por anticuerpo. hLIV-14d-vcMMAE(2) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene una media de 2 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo, cada una conjugada en la posición S239C de cada cadena pesada. hLIV-14d-mcMMAF(2) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene una media de 2 moléculas conectoras del fármaco mcMMAF por anticuerpo, cada una conjugada en la posición S239C de cada cadena pesada. H00-vcMMAE(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo de un anticuerpo de control no fijante que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco vcMMAE por anticuerpo. H00-mcMMAF(4) hace referencia a un conjugado fármaco-anticuerpo de un anticuerpo de control no fijante que tiene una media de 4 moléculas conectoras del fármaco mcMMAF por anticuerpo. La dosis y el momento de administración están indicados en la figura.

En las figuras 16A y 16B se muestra el alineamiento de las regiones variables maduras de la cadena pesada (figura 16A) y de la cadena ligera (figura 16B) humanizadas con las de BR2-22a de ratón.

- 20 En la figura 17 se muestran los ensayos de fijación competitiva de diferentes permutaciones de las cadenas pesadas humanizadas HA-HF y de las cadenas ligeras humanizadas LA-LF procedentes del anticuerpo anti-LIV-1 murino monoclonal BR2-22a. El número total de retromutaciones murinas en cada cadena ligera o pesada se muestra entre paréntesis. Solo HELF mostró la retención de fijación suficiente.

- 25 En la figura 18 se muestra la variación sistemática de las cadenas de HE y LF para analizar la contribución de cada retromutación a la fijación del antígeno. Los sitios de posible hipermutación somática están entre paréntesis. Los restos de ratón están subrayados. Los demás restos son los restos de las células germinales de humano.

En la figura 19 se muestra la fijación competitiva de las variantes de LF en la parte superior de la figura. Las retromutaciones analizadas se muestran en la parte inferior de la figura. Los restos de ratón están subrayados. Los demás restos son los restos de las células germinales de humano.

- 30 En la figura 20 se muestra la fijación competitiva de las variantes de HE en la parte superior de la figura. Las retromutaciones analizadas se muestran en la parte inferior de la figura. Los restos de ratón están subrayados. Los demás restos son los restos de las células germinales de humano.

En la figura 21 se muestra la fijación competitiva de diferentes permutaciones de HE, HF, HG, y LF y LG.

- 35 En la figura 22 se muestra la fijación a saturación del anticuerpo LIV14 humanizado y del anticuerpo LIV22 humanizado sobre el LIV-1 de humano y de macaco cangrejero expresado en las células CHO.

En la figura 23 se muestra la actividad citotóxica de LIV22-vcMMAE humanizado sobre las células MCF-7 después de 144 h de tratamiento. h00-1006 es un conjugado de fármaco al anticuerpo de control.

En la figura 24 se muestra la actividad citotóxica de hLIV22-mcMMAF sobre las células MCF-7 después de 144 h de tratamiento. h00-1269 es un conjugado de fármaco al anticuerpo de control.

- 40 En la figura 25 se muestra la actividad del anticuerpo hLIV22 sobre el modelo del carcinoma de próstata PC3 (DSMZ) en las ratonas hembra atímicas. Los días de la dosis se indican con triángulos en el eje X.

En la figura 26 se muestra la actividad del anticuerpo hLIV22 sobre los tumores del carcinoma de mama MCF7 (NCI) en los ratones atímicos.

En la figura 27 se compara la actividad de hLIV22 y hLIV14 en el mismo modelo que en la figura 26.

- 45 La figura 28 muestra un análisis de la expresión de la proteína LIV-1 por IHQ en las muestras de pacientes con melanoma canceroso.

Definiciones

- 50 Los anticuerpos monoclonales se suministran típicamente en forma aislada. Esto significa que un anticuerpo está típicamente puro al menos al 50% p/p de las proteínas que interfieren y de otros contaminantes que aparecen durante su producción o purificación, pero no descarta la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal esté combinado con un exceso de vehículo(s) farmacéuticamente aceptable(s) u otro vehículo con el que se pretenda facilitar su uso. Algunas veces, los anticuerpos monoclonales están puros al menos al 60%, 70%, 80%, 90%, 95 o

99% p/p de las proteínas que interfieren y de los contaminantes que aparecen durante su producción o su purificación.

La fijación específica de un anticuerpo monoclonal a su antígeno diana significa que la afinidad es de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M^{-1} . La fijación específica es detectablemente más alta en magnitud y diferenciable de la fijación inespecífica que se produce en al menos una diana no relacionada. La fijación específica puede ser el resultado de la formación de enlaces entre grupos funcionales concretos o un ajuste espacial concreto (p. ej., de tipo llave y cerradura), mientras que la fijación inespecífica es normalmente el resultado de las fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la fijación específica no implica, necesariamente, que un anticuerpo monoclonal se fije a una, y solo a una, diana.

La unidad estructural básica del anticuerpo es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, en donde cada pareja tiene una cadena «ligera» (aproximadamente 25 kDa) y una cadena «pesada» (aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Esta región variable se expresa inicialmente conectada a un péptido señal escindible. La región variable sin el péptido señal se denomina a veces una región variable madura. Así pues, por ejemplo, una región variable madura de la cadena ligera hace referencia a una región variable de cadena ligera sin el péptido señal de la cadena ligera. La porción del extremo carboxilo de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican como κ o bien como λ . Las cadenas pesadas se clasifican como γ , μ , α , δ , o ϵ , y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante se juntan por una región «J» de aproximadamente 12 o más aminoácidos, en donde la cadena pesada también incluye una región «D» de aproximadamente 10 o más aminoácidos (véase, de forma general, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2.^a ed. Raven Press, N.Y., 1989, cap. 7)).

Las regiones variables maduras de cada pareja de cadenas ligera/pesada forman el sitio de fijación del anticuerpo. Así pues, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de fijación. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de fijación son iguales. Las cadenas muestran todas la misma estructura general de regiones flanqueantes (FR) relativamente conservadas juntadas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR (por su nombre en inglés). Las CDR de las dos cadenas de cada pareja se alinean por las regiones flanqueantes, lo que permite la fijación a un epítipo específico. Desde el extremo amino al extremo carboxilo, las cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de los aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991), o Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342: 878-883 (1989). Kabat también da a conocer una convención de numeración ampliamente utilizada (numeración de Kabat) en la que a los restos que se corresponden entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número.

El término «anticuerpo» incluye anticuerpos intactos y fragmentos de fijación de los mismos. Típicamente, los fragmentos de anticuerpo compiten con el anticuerpo intacto del cual proceden por la fijación específica a la diana, que incluye cadenas pesadas independientes, cadenas ligeras, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, diacuerpos, Dacs, nanocuerpos y Fv. Los fragmentos se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante o mediante separación enzimática o química de las inmunoglobulinas intactas. El término «anticuerpo» también incluye un diacuerpo (fragmento Fv homodimérico) o un minicuerpo (V_L-V_H-C_H3), un anticuerpo biespecífico o similares. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos parejas de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de fijación diferentes (véase, p. ej., Songvilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79: 315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148: 1547-53 (1992)). El término «anticuerpo» incluye un anticuerpo por sí mismo (anticuerpo desnudo) o un anticuerpo conjugado a un fármaco citotóxico o citostático.

El término «epítipo» hace referencia a un sitio en un antígeno al cual se fija un anticuerpo. Un epítipo puede estar formado por aminoácidos contiguos o no contiguos que se yuxtaponen por el plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítipos formados por aminoácidos contiguos se conservan típicamente durante la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por el plegamiento terciario se pierden típicamente durante el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y con más frecuencia, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p. ej., «Epitope Mapping Protocols», en *Methods in Molecular Biology*, vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Los anticuerpos que reconocen los mismos epítipos o epítipos solapantes se pueden identificar en un simple inmunoensayo que muestra la capacidad que tiene un anticuerpo para competir con la fijación de otro anticuerpo a un antígeno diana. El epítipo de un anticuerpo también se puede definir mediante la cristalografía de rayos x del anticuerpo fijado a su antígeno para identificar los restos de contacto. Como alternativa, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la fijación de un

anticuerpo reducen o eliminan la fijación del otro. Dos anticuerpos tienen epítomos solapantes si algunas mutaciones aminoacídicas que reducen o eliminan la fijación de un anticuerpo reducen o eliminan la fijación del otro.

La competición entre los anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que un anticuerpo problema inhibe la fijación específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (véase, p. ej., Junghans et al., *Cancer Res.* 50: 1495, 1990). Un anticuerpo problema compite con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo problema (p. ej., al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la fijación del anticuerpo de referencia al menos al 50%, pero preferiblemente al 75%, 90% o 99%, según se mide en un ensayo de fijación competitiva. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo competitivo (anticuerpos en competición) incluyen anticuerpos que se fijan al mismo epítomo que el anticuerpo de referencia y los anticuerpos que se fijan a un epítomo adyacente suficientemente próximo al epítomo fijado por el anticuerpo de referencia para que se produzca el impedimento estérico.

El término «paciente» incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o bien terapéutico.

Para los propósitos de clasificación de las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan como sigue: grupo I (cadenas laterales hidrófobas): met, ala, val, leu, ile; grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; grupo V (restos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre los aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

El porcentaje de identidad de secuencia se determina con las secuencias de anticuerpo alineadas al máximo mediante la convención de numeración de Kabat. Después del alineamiento, si una región del anticuerpo estudiado (por ejemplo, la región variable madura completa de una cadena pesada o ligera) se está comparando con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones de anticuerpo estudiado y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido tanto en la región de anticuerpo estudiado como de referencia dividido por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, sin contar los huecos, multiplicado por 100 para convertirlo en porcentaje.

Las composiciones o los métodos «que comprenden» uno o varios elementos relacionados podrían incluir otros elementos no relacionados específicamente. Por ejemplo, una composición que comprende el anticuerpo podría contener el anticuerpo solo o en combinación con otros ingredientes.

La designación de un margen de valores incluye todos los enteros que caen dentro del margen o que lo definen.

Una función efectora del anticuerpo hace referencia a una función a la que contribuyen uno o varios dominios Fc de una Ig. Tales funciones pueden ser, por ejemplo, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo, o la citotoxicidad dependiente de complemento. Dicha función puede ser efectuada, por ejemplo, por la fijación de uno o varios dominios efectores Fc a un receptor de Fc en una célula inmunitaria con actividad fagocítica o lítica, o mediante la fijación de uno o varios dominios efectores Fc a los componentes del sistema del complemento. Típicamente, el o los efectos mediados por las células que se fijan a Fc o los componentes del complemento dan lugar a la inhibición y/o agotamiento de la célula diana con LIV-1. Las regiones Fc de los anticuerpos pueden reclutar las células que expresan el receptor de Fc (FcR) y yuxtaponerlos con las células diana revestidas con anticuerpo. Las células que expresan en la superficie el FcR para las IgG que incluyen FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD64) pueden actuar como células efectoras para la destrucción de células revestidas de IgG. Dichas células efectoras incluyen monocitos, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (NK, por su nombre en inglés), neutrófilos y eosinófilos. El enganche del FcγR a la IgG activa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (FCDA). La CCDA está mediada por células efectoras CD16⁺ por medio de la secreción de proteínas formadoras de poros en la membrana y de proteasas, mientras que la fagocitosis está mediada por células efectoras CD32⁺ y CD64⁺ (véase *Fundamental Immunology*, 4.^a ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N. Y., 1997, capítulos 3, 17 y 30; Uchida et al., 2004, *J. Exp. Med.* 199: 1659-69; Akewanlop et al., 2001, *Cancer Res.* 61: 4061-65; Watanabe et al., 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 53: 199-207). Además de CCDA y FCDA, las regiones Fc de los anticuerpos fijados a las células pueden también activar la vía clásica del complemento para desencadenar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). El C1q del sistema del complemento se fija a las regiones Fc de los anticuerpos cuando forman complejo con antígenos. La fijación de C1q a los anticuerpos fijados a las células inicia una cascada de acontecimientos que implican la activación proteolítica de C4 y C2 para generar la C3 convertasa. La escisión de C3 en C3b por la C3 convertasa permite la activación de los últimos componentes del complemento, que incluyen C5b, C6, C7, C8 y C9. En conjunto, estas proteínas forman poros complejos que atacan las membranas de las células revestidas con anticuerpos. Estos poros destruyen la integridad de la membrana de la célula y acaban con la célula diana (véase *Immunobiology*, 6.^a ed., Janeway et al., Garland Science, N. Y., 2005, capítulo 2).

La terminología «citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos» o CCDA es un mecanismo para inducir la muerte celular que depende la interacción de las células diana revestidas con anticuerpos con las células inmunitarias que poseen actividad lítica (también denominadas células efectoras). Tales células efectoras incluyen linfocitos citolíticos

naturales, monocitos/macrófagos y neutrófilos. Las células efectoras se pegan a uno o varios dominios efectores Fc de la Ig fijada a las células diana a través de los sitios de combinación al antígeno. La muerte de la célula diana revestida de anticuerpos se produce como resultado de la actividad de las células efectoras.

5 La terminología «fagocitosis celular dependiente de anticuerpos» o FCDA hace referencia al proceso mediante el cual las células revestidas de anticuerpos son internalizadas, enteras o bien una parte, por células inmunitarias fagocíticas (p. ej., macrófagos, neutrófilos y células dendríticas) que se fijan a uno o varios dominios efectores Fc de las Ig.

10 La terminología «citotoxicidad dependiente de complemento» o CDC hace referencia a un mecanismo para inducir la muerte celular, en el que uno o varios dominios efectores Fc de un anticuerpo fijado a la diana activa una serie de reacciones enzimáticas que culminan en la formación de agujeros en la membrana de las células diana. Típicamente, se fijan los complejos antígeno-anticuerpo, tales como los de las células diana revestidas de anticuerpos, y activan el componente del complemento C1q, el cual, a su vez, activa la cascada del complemento que conduce a la muerte de la célula diana. La activación del complemento también podría dar lugar al depósito de los componentes del complemento sobre la superficie de las células diana que facilitan la CCDA mediante la fijación de los receptores del complemento (p. ej., CR3) de los leucocitos.

15 Un «efecto citotóxico» hace referencia a la desaparición, eliminación y/o la muerte de una célula diana. Un «agente citotóxico» hace referencia a un agente que tiene un efecto citotóxico sobre una célula. Los agentes citotóxicos se pueden conjugar a un anticuerpo o se pueden administrar en combinación con un anticuerpo.

20 Un "efecto citostático" hace referencia a la inhibición de la proliferación celular. Un "agente citostático" hace referencia a un agente que tiene un efecto citostático en una célula, mediante lo cual se inhibe el crecimiento y/o expansión de un subconjunto específico de células. Los agentes citostáticos se pueden conjugar a un anticuerpo o se pueden administrar en combinación con un anticuerpo.

25 El término «farmacéuticamente aceptable» significa que está aprobado o se puede aprobar por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o que está recogido en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea reconocida de manera general para ser usado en los animales y, más en particular, en los humanos. El término «ingrediente farmacéuticamente compatible» hace referencia a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo farmacéuticamente aceptable con el cual un anticuerpo anti-LIV-1.

30 La frase «sal farmacéuticamente aceptable» hace referencia a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un anticuerpo anti-LIV-1 o conjugado del mismo o agente administrado con un anticuerpo anti-LIV-1. Las sales de ejemplo incluyen sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (a saber, bis-(2-hidroxi-3-naftoato) de 1,1'-metileno). Una sal farmacéuticamente aceptable podría implicar la inclusión de otra molécula, tal como un ion de acetato, un ion de succinato u otro contraión. El contraión podría ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga del compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable podría tener más de un átomo cargado en su estructura. Los ejemplos donde muchos átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o varios átomos cargados y/o uno o varios contraiones.

40 A menos que sea evidente de otra manera a partir del contexto, el término «aproximadamente» abarca valores dentro de una desviación estándar de un valor mencionado.

Descripción detallada

I. General

45 La invención da a conocer anticuerpos monoclonales que se fijan específicamente al LIV-1. Los anticuerpos son útiles para el tratamiento y el diagnóstico de diferentes cánceres, así como para detectar el LIV-1.

II. Moléculas destinatarias

50 A menos que se indique otra cosa, LIV-1 significa un LIV-1 de humano. Una secuencia humana de ejemplo tiene asignado el número de acceso de SwissProt Q13433. Q13433 está incluida en la presente memoria como la SEQ ID n.º 83. Se conocen tres isoformas variantes y un polimorfismo. En la presente memoria se incluye una segunda versión de la proteína LIV-1 de humano, de número de acceso AAA96258.2, como la SEQ ID n.º 84. Cuatro dominios extracelulares están delimitados por los restos 29-325, 377-423, 679-686 y 746-755 de Q13433, respectivamente.

55 A menos que resulte evidente de otra manera a partir de la referencia del contexto, LIV-1 significa al menos un dominio extracelular de la proteína y normalmente la proteína completa que no corresponde a un péptido señal escindible (los aminoácidos 1-28 de Q13433).

III. Anticuerpos

A. Especificidad de fijación y propiedades funcionales

Se describen en la presente memoria anticuerpos humanizados procedentes de dos anticuerpos de ratón, BR2-14a y BR2-22a. A menos que se indique específicamente de otra manera, las presentes descripciones hacen referencia a ambos anticuerpos. Los dos anticuerpos de ratón muestran una identidad de secuencia del 94% y el 91% entre sí en las regiones variables maduras de las cadenas ligera y pesada. Los dos anticuerpos se fijan al mismo epítipo o epítopos solapantes en el LIV-1 de humano. No obstante, el anticuerpo BR2-22a tiene una afinidad aproximadamente diez veces mayor por el LIV-1 de humano y una afinidad aproximadamente 3 veces mayor por el LIV-1 de macaco cangrejero que el BR2-14a, según se muestra en la figura 22.

La afinidad de las formas humanizadas del anticuerpo BR2-14a de ratón (a saber, K_a) está preferiblemente dentro de un factor de cinco o un factor de dos del anticuerpo de ratón BR2-14a contra LIV-1 de humano. Los anticuerpos BR2-14a humanizados se fijan específicamente al LIV-1 de humano en la forma nativa y/o se expresan recombinantemente desde las células CHO, como hace el anticuerpo de ratón del que proceden. Los anticuerpos BR2-14a humanizados preferidos tienen una afinidad que es igual o mayor que (a saber, mayor que por encima del margen de error de la medición) la de BR2-14a por el LIV-1 de humano (p. ej., de 1,1 a 5 veces, de 1,1 a 3 veces, de 1,5 a 3 veces, de 1,7 a 2,3 veces, o de 1,7 a 2,1 veces la afinidad, o aproximadamente 2 veces la afinidad de BR2-14a). Los anticuerpos BR2-14a humanizados preferidos se fijan al mismo epítipo y/o compiten con BR2-14a por la fijación al LIV-1 de humano. Los anticuerpos BR2-14a humanizados preferidos también se fijan al homólogo de macaco cangrejero de LIV-1, lo que así permite realizar pruebas preclínicas en primates no humanos.

La afinidad de las formas humanizadas del anticuerpo BR2-22a de ratón (a saber, K_a) por el LIV-1 de humano, que se expresa de forma nativa o se expresa desde las células CHO, está preferiblemente dentro de un factor de cinco o un factor de dos de la del anticuerpo BR2-22 de ratón. Algunos anticuerpos BR2-22a humanizados tienen una constante de asociación que es esencialmente igual que la de BR2-22a (a saber, dentro del error experimental). Algunos anticuerpos BR2-22a humanizados tienen una constante de asociación dentro de un margen de 0,5 a 1, o de 0,5 a 1,5 de la de la constante de asociación del anticuerpo BR2-22a. Los anticuerpos BR2-22a humanizados preferidos tienen una constante de asociación mayor de $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, o en un margen de 0,5 a $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ o aproximadamente $0,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (\pm error de la medición) por el LIV-1 de humano expresado desde las células CHO. Aquí como en cualquier otra parte de esta solicitud, las afinidades se pueden medir conforme a los métodos de los ejemplos. Los anticuerpos BR2-22a humanizados preferidos se fijan al mismo epítipo y/o compiten con BR2-22a por la fijación al LIV-1 de humano. Los anticuerpos BR2-22a humanizados se fijan al homólogo del LIV-1 de macaco cangrejero, así como al LIV-1 de humano. Los anticuerpos BR2-22a humanizados preferidos se fijan con esencialmente la misma constante de asociación al LIV-1 de humano y de macaco cangrejero, ambos expresados desde las células CHO (dentro del error experimental), lo que así permite e incrementa la exactitud predictiva de las pruebas preclínicas en los primates no humanos.

Los anticuerpos preferidos (tanto BR2-14a humanizado como BR2-22a humanizado) inhiben el cáncer (p. ej., crecimiento de células, metástasis y/o mortalidad para los organismos), tal y como se muestra en las células cancerosas que se propagan en cultivo, en un modelo animal o en ensayo clínico. Los modelos animales se pueden formar mediante la implantación de las líneas de células tumorales humanas que expresan el LIV-1 en las cepas de roedores inmunodeficientes adecuadas, p. ej., ratones lampiños atímicos o ratones con IDCG. Estas líneas de células tumorales se pueden establecer en roedores hospedadores que son inmunodeficientes, bien como tumor sólido mediante inyecciones subcutáneas, o como tumores diseminados mediante inyecciones intravenosas. Una vez que se establece dentro de un hospedador, estos modelos tumorales se pueden aplicar para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-LIV-1 o de las formas conjugadas de los mismos, tal y como se describe en los ejemplos.

B. Anticuerpos humanizados

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado genéticamente en el que las CDR de un anticuerpo «donante» no humano están injertadas en las secuencias del anticuerpo «aceptor» de humano (véanse, p. ej., los documentos Queen, US 5.530.101 y 5.585.089; Winter, US 5.225.539; Carter, US 6.407.213; Adair, US 5.859.205; y Foote, US 6.881.557). Las secuencias del anticuerpo aceptor pueden ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo maduro de humano, una mezcla de tales secuencias, una secuencia consenso de las secuencias de anticuerpos de humano, o una secuencia de la región de la línea germinal. Una secuencia aceptora preferida para la cadena pesada es el exón V_{H1-2} de la V_H de la línea germinal (también denominada en la bibliografía HV1-2) (Shin et al., 1991, *EMBO J.* 10: 3641-3645) y para la región bisagra (J_H), el exón J_{H-6} (Mattila et al., 1995, *Eur. J. Immunol.* 25: 2578-2582). Para la cadena ligera, una secuencia aceptora preferida es el exón VK2-30 (al que también se denomina KV2-30 en la bibliografía) y para la región bisagra, el exón J_{k-4} (Hieter et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 1516-1522). Así pues, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene algunas o todas las CDR total o sustancialmente de un anticuerpo donante, y las secuencias flanqueantes de la región variable y las regiones constantes, si están presentes, total o sustancialmente de las secuencias de anticuerpo de humano. De igual forma, una cadena pesada humanizada tiene al menos una, dos y normalmente las tres CDR total o sustancialmente de una cadena pesada de anticuerpo donante, y una secuencia flanqueante de la región variable de la cadena pesada y

la región constante de la cadena pesada, si está presente, sustancialmente de las secuencias flanqueantes de la región variable de la cadena pesada y de las secuencias de la región constante de humano. De igual forma, una cadena ligera humanizada tiene al menos una, dos y normalmente las tres CDR total o sustancialmente de una cadena ligera de anticuerpo donante, y una secuencia flanqueante de la región variable de la cadena ligera y la región constante de la cadena pesada, si está presente, sustancialmente de las secuencias flanqueantes de la región variable de la cadena ligera y de las secuencias de la región constante de humano. Además de los nanocuerpos y los dAcS, un anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Una CDR de un anticuerpo humanizado procede sustancialmente de una CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando al menos el 60%, 85%, 90%, 95% o 100% de los correspondientes restos (según los define Kabat) son idénticos entre las correspondientes CDR. Las secuencias flanqueantes de la región variable de una cadena de anticuerpo o la región constante de una cadena de anticuerpo son sustancialmente de una secuencia flanqueante de la región variable de humano o de una región constante de humano, respectivamente, cuando al menos el 85%, 90%, 95% o 100% de los restos correspondientes definidos por Kabat son idénticos.

Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan las seis CDR (preferiblemente según las define Kabat) de un anticuerpo de ratón, también se pueden hacer con menos de todas las CDR (p. ej., al menos 3, 4 o 5) CDR de un anticuerpo de ratón (p. ej., Pascalis et al., *J. Immunol.* 169: 3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36: 1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164: 1432-1441, 2000).

Determinados aminoácidos de los restos flanqueantes de la región variable de humano se pueden seleccionar para la sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de la CDR y/o la fijación al antígeno. La investigación de tales posibles influencias es mediante modelación, evaluación de las características de los aminoácidos en localizaciones concretas, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o la mutagénesis de determinados aminoácidos.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un resto flanqueante de la región variable murina y un resto flanqueante de la región variable de humano seleccionada, el aminoácido flanqueante de humano se puede sustituir por el aminoácido flanqueante equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se fije no covalentemente al antígeno directamente,
- (2) sea adyacente a una CDR,
- (3) que interaccione, si no, con una CDR (p. ej., está a menos de aproximadamente 6 Å de una CDR); o
- (4) interviene en la interacción entre las cadenas pesada y ligera.

La descripción da a conocer formas humanizadas del anticuerpo BR2-14a de ratón que incluyen cinco regiones variables humanizadas y maduras de la cadena pesada de ejemplo (HA-HE) y seis regiones variables humanizadas y maduras de la cadena ligera de ejemplo (LA-LF). Las permutaciones de estas cadenas que tienen la fijación más fuerte (EC50 más baja) son HBLB, HBLF, HCLB, HCLF, HDLB, HDLF, HELE y HELF. De estas permutaciones, se prefiere HBLB (también conocida como hLIV14) porque tiene la fijación más fuerte, aproximadamente 2 veces más fuerte que el anticuerpo donante de ratón, y tiene el menor número de retromutaciones (cuatro).

También se describen variantes del anticuerpo humanizado HBLB en las que la región variable madura y humanizada de la cadena pesada muestra una identidad de al menos el 90%, 95% o 99% con la SEQ ID n.º 10, y la región variable madura y humanizada de la cadena ligera muestra una identidad de secuencia de al menos el 90%, 95% o 99% con la SEQ ID n.º 15. Preferiblemente, en tales anticuerpos, se conservan algunas o todas las retromutaciones de HBLB. Es decir, al menos 1, 2 o preferiblemente las 3 posiciones de cadena pesada H29, H30 y H76 están ocupadas por I y E y N, respectivamente. Asimismo, la posición L36 está preferiblemente ocupada por Y. Las CDR de tales anticuerpos humanizados son de forma preferible sustancialmente idénticas a las CDR de HBLB, que son iguales a las del anticuerpo donante de ratón. Las CDR se pueden definir mediante cualquier definición convencional (p. ej., Chothia), pero son preferiblemente según define Kabat. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 10 y las secuencias flanqueantes de la región variable con una identidad de secuencia de al menos el 95% con las secuencias flanqueantes de la región variable de SEQ ID n.º 10. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 15 y las secuencias flanqueantes de la región variable con una identidad de al menos el 95% con las secuencias flanqueantes de la región variable de SEQ ID n.º 15. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 10 y las secuencias flanqueantes de la región variable con una identidad de al menos el 95% con las secuencias flanqueantes de la región variable de SEQ ID n.º 10, y una cadena ligera que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 15, y secuencias flanqueantes de la región variable con una identidad de al menos el 95% con las secuencias flanqueantes de la región variable de SEQ ID n.º 15.

En la medida en que como anticuerpos humanizados muestran cualquier variación del anticuerpo humanizado HBLB de ejemplo, una posibilidad para tal variación adicional son las retromutaciones adicionales en las secuencias

flanqueantes de la región variable. También se puede fabricar cualquiera o todas las posiciones retromutadas en otras regiones variables maduras de cadena pesada o ligera de humano de ejemplo (a saber, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o las 9 de H27 ocupada por F, H28 ocupada por N, H48 ocupada por I, H66 ocupada por K, H67 ocupada por A, H71 ocupada por A, H76 ocupada por N, H93 ocupada por N y H94 ocupada por V en la cadena pesada, y 1, 2, 3, 4 o las 5 de L37 ocupada por L, L39 ocupada por K, L45 ocupada por K, y L46 ocupada por L en la cadena ligera). Sin embargo, tales retromutaciones adicionales no se prefieren porque en general no mejoran la afinidad, y la introducción de más restos de ratón podría incrementar el riesgo de inmunogenia.

En la presente memoria están descritas formas humanizadas del anticuerpo BR2-22a de ratón, que incluyen tres regiones variables maduras y humanizadas de la cadena pesada de ejemplo (HE, HF y HG) y dos cadenas ligeras humanizadas de ejemplo (LF y LG) que se pueden combinar en diferentes permutaciones con la fijación adecuada (véase la figura 21). De estas permutaciones, se prefiere HGLG (también conocida como hLIV22) porque tiene la mejor combinación de propiedades de fijación (esencialmente las mismas que el anticuerpo BR2-22a de ratón dentro del error experimental) y el menor número de retromutaciones (siete).

También se describen variantes del anticuerpo humanizado HGLG en las que la región variable madura y humanizada de la cadena pesada muestra una identidad de al menos el 90%, 95%, 98% o 99% con la SEQ ID n.º 53, y la región variable madura y humanizada de la cadena ligera muestra una identidad de secuencia de al menos el 90%, 95%, 98% o 99% con la SEQ ID n.º 60. Preferiblemente, en tales anticuerpos, se conservan algunas o todas las retromutaciones de HGLG. En otras palabras, al menos 1, 2, 3, 4 o preferiblemente las 5 posiciones de la cadena pesada H27, H29, H30, H76 y H94 están ocupadas por L, I, E, N y V (aquí, como en cualquier parte de esta solicitud, se utiliza la numeración de Kabat para describir las posiciones en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada maduras). De estas retromutaciones, H94 es la que más contribuye a la retención de la afinidad de fijación, y H76 la que menos. Asimismo, las posiciones L36 y L46 están preferiblemente ocupadas por Y y P, respectivamente. Las CDR de tales anticuerpos humanizados son de manera preferible sustancialmente idénticas a las CDR de HGLG, que son iguales a las del anticuerpo donante de ratón. Las CDR se pueden definir mediante cualquier definición convencional (p. ej., Chothia), pero son preferiblemente según las define Kabat. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 53 y las secuencias flanqueantes de la región variable con una identidad de al menos el 95% con las secuencias flanqueantes de la región variable de SEQ ID n.º 53. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 60 y las secuencias flanqueantes de la región variable con una identidad de al menos el 95% con las secuencias flanqueantes de la región variable de SEQ ID n.º 60. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 53 y las secuencias flanqueantes de la región variable con una identidad de al menos el 95% con las secuencias flanqueantes de la región variable de SEQ ID n.º 53, y una cadena ligera que comprende las 3 CDR de SEQ ID n.º 60, y las secuencias flanqueantes de la región variable con una identidad de al menos el 95% con las secuencias flanqueantes de la región variable de SEQ ID n.º 60.

En la medida en que como anticuerpos BR2-22a humanizados muestran cualquier variación del anticuerpo humanizado HGLG de ejemplo, una posibilidad para tal variación adicional son las retromutaciones adicionales en las secuencias flanqueantes de la región variable. También se pueden hacer cualquiera de las posiciones retromutadas en otras regiones variables maduras y humanizadas de las cadenas ligera o pesada de ejemplo (a saber, 1, 2, 3, 4, 5, o las 6, de H28 ocupada por N, H48 ocupada por I, H66 ocupada por K, H67 ocupada por A, H71 ocupada por A, H93 ocupada por T en la cadena pesada, y 1 o 2 de L37 ocupada por L y L45 ocupada por K). Sin embargo, tales retromutaciones adicionales no son preferidas porque en general no mejoran la afinidad, y la introducción de más restos de ratón podría incrementar el riesgo de inmunogenia.

Otra posible variación es sustituir determinados restos en las CDR del anticuerpo de ratón por los correspondientes restos de las secuencias de CDR de humano, típicamente de las CDR de las secuenciasceptoras humanas utilizadas para el diseño de los anticuerpos humanizados de ejemplo. En algunos anticuerpos, solo parte de las CDR, a saber, el subconjunto de restos de CDR necesarios para la fijación, denominados SDR, se necesitan para conservar la fijación en un anticuerpo humanizado. Los restos de las CDR que no entran en contacto con el antígeno y que no están en las SDR se pueden identificar basándose en los estudios anteriores (por ejemplo, a menudo no se necesitan los restos H60-H65 en la CDR H2), de regiones de las CDR de Kabat que se ubican fuera de los bucles hipervariables de Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196: 901, 1987), mediante el modelado molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863 (2004). En tales anticuerpos humanizados en las posiciones en las que están ausentes uno o más restos de las CDR donantes o en las que se omite una CDR donante entera, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la correspondiente posición (según la numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de tales sustituciones de aminoácidos aceptores por donantes en las CDR a incluir refleja un equilibrio de las consideraciones que compiten. Tales sustituciones son potencialmente ventajosas al disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, en consecuencia, disminuir la posible inmunogenia. Sin embargo, las sustituciones también pueden ocasionar cambios de afinidad, y se evitan preferiblemente las reducciones significativas de la afinidad. En otra variación, uno o más restos en una CDR de un anticuerpo BR2-22a humanizado (que si no sería la misma que la CDR del anticuerpo BR2-22a de ratón) se puede reemplazar por los correspondientes restos de una CDR del anticuerpo BR2-14a de ratón (o viceversa). También se pueden seleccionarse de forma empírica las posiciones para sustitución en las CDR y los aminoácidos a sustituir.

Aunque no son preferidas, se pueden realizar otras sustituciones aminoacídicas, por ejemplo, en los restos flanqueantes que no están en contacto con las CDR, o incluso algunos restos aminoacídicos posiblemente en contacto con las CDR dentro de las CDR. A menudo, las sustituciones hechas en las secuencias humanizadas variantes son conservativas con respecto al reemplazo de los aminoácidos de HBLB (en el caso del BR2-14a humanizado) o de los aminoácidos de HGLG (en el caso del BR2-22 humanizado). Preferiblemente, los reemplazos con respecto a HBLB o HGLG (tanto si son como si no son conservativos) no tienen un efecto sustancial sobre la afinidad o la potencia de fijación de los Acm humanizados, esto es, su capacidad para fijarse al LIV-1 de humano e inhibir el crecimiento de las células cancerosas.

Las variantes difieren típicamente de las secuencias de la región variable madura de las cadenas ligera y pesada de HBLB (hLIV14) o HGLG (hLIV22) en un número pequeño (p. ej., típicamente no más de 1, 2, 3, 5 o 10 en la región variable madura de la cadena ligera o bien de la cadena pesada, o en ambas) de reemplazos, deleciones o inserciones.

C. Selección de la región constante

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos humanizados se pueden unir al menos a una porción de una región constante de humano. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad dependiente de complemento. Por ejemplo, los isotipos humanos IgG1 e IgG3 tienen una citotoxicidad fuerte dependiente de complemento, el isotipo humano IgG2 tiene una citotoxicidad débil dependiente de complemento, y el IgG4 humano carece de citotoxicidad dependiente de complemento. IgG1 e IgG3 de humano también inducen funciones efectoras mediadas por células más fuertes que IgG2 e IgG4 de humano. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser λ o κ . Los anticuerpos se pueden expresar como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, como cadenas pesadas independientes, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como anticuerpos de cadena única en los que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera están conectados por un espaciador.

Las regiones constantes de humano presentan variación alotípica y variación isoalotípica entre diferentes individuos, es decir, las regiones constantes pueden diferir en individuos diferentes en una o varias posiciones polimórficas. Los isoalotipos difieren de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se fijan a una región no polimórfica de uno o varios isotipos distintos.

Uno o varios aminoácidos del extremo amino o carboxilo de la cadena ligera y/o pesada, tal como la lisina del extremo carboxilo de la cadena pesada, podría estar ausente o modificado en una parte o en todas las moléculas. Las sustituciones se pueden realizar en la región constante para reducir o incrementar la función efectora, tal como la citotoxicidad mediada por el complemento o la CCDA (véase, p. ej., Winter et al., patente de los EE. UU. n.º 5.624.821; Tso et al., patente de los EE. UU. n.º 5.834.597; y Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 4005, 2006), o para prolongar la semivida en los humanos (véase, p. ej., Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279: 6213, 2004).

La sustitución de ejemplo incluye la sustitución aminoacídica del aminoácido nativo por un resto de cisteína que se introduce en la posición aminoacídica 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 o 332, preferiblemente una mutación S239C en un isotipo IgG1 de humano (US 2010/0158909). La presencia de un resto adicional de cisteína permite la formación de enlaces disulfuro entre las cadenas. Dicha formación de enlaces disulfuro entre cadenas puede ocasionar impedimento estérico, con lo que se reduce la afinidad de la interacción de fijación de la región Fc al Fc γ R. El o los restos de cisteína introducidos en o cerca de la región Fc de la región constante de una IgG también pueden servir como sitios para la conjugación a agentes terapéuticos (es decir, acoplamiento de fármacos citotóxicos mediante el uso de reactivos específicos de tiol, tales como derivados de fármacos por maleimidación). La presencia de un agente terapéutico ocasiona un impedimento estérico, con lo que se reduce además la afinidad de la interacción de fijación de la región Fc al Fc γ R. Otras sustituciones en cualquiera de las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 reducen la afinidad por los receptores de Fc γ , en particular el receptor Fc γ RI (véase, p. ej., las patentes de los EE. UU. US 6.624.821, US 5.624.821).

La semivida *in vivo* de un anticuerpo también puede afectar a sus funciones efectoras. La semivida de un anticuerpo se puede incrementar o disminuir para modificar su actividad terapéutica. FcRn es un receptor que es estructuralmente similar al antígeno del CMH de clase I que se asocia de forma no covalente a la microglobulina β 2. FcRn regula el catabolismo de las IgG y su transcitosis a través de los tejidos (Ghetie y Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18: 739-766; Ghetie y Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25: 97-113). La interacción IgG-FcRn tiene lugar a pH 6,0 (pH de las vesículas intracelulares), pero no a pH 7,4 (pH de la sangre); esta interacción permite que las IgG se reciclen de vuelta al torrente circulatorio (Ghetie y Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.* 18: 739-766; Ghetie y Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25: 97-113). Se ha mapeado la región de la IgG1 de humano implicada en la fijación al FcRn (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-604). Las sustituciones de alanina en las posiciones Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382, o Asn434 de la IgG1 de humano potencian la fijación al FcRn (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-604). Las moléculas de IgG1 que portan estas sustituciones tienen semividas en suero más largas. En consecuencia, estas moléculas de IgG1 modificadas también podrían ser capaces de llevar a cabo sus funciones efectoras, y, por lo tanto, ejercer su eficacia terapéutica, durante un periodo de tiempo mayor que la IgG1 sin modificar. Otras sustituciones de ejemplo para incrementar la fijación al FcRn incluyen una Gln en la

posición 250 y/o Leu en la posición 428. Se utiliza la numeración de la UE para todas las posiciones de la región constante.

5 Los oligosacáridos unidos covalentemente a la Asn297 conservada están implicados en la capacidad que tiene la región Fc de una IgG para fijarse al FcγR (Lund et al., 1996, *J. Immunol.* 157: 4963-69; Wright y Morrison, 1997, *Trends Biotechnol.* 15: 26-31). La manipulación genética de esta glucoforma de la IgG puede mejorar significativamente la CCDA mediada por IgG. La adición de modificaciones de *N*-acetilglucosamina biseccionantes (Umana et al., 1999, *Nat. Biotechnol.* 17: 176-180; Davies et al., 2001, *Biotech. Bioeng.* 74: 288-94) a esta glucoforma o la retirada de la fucosa (Shields et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277: 26733-40; Shinkawa et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278: 6591-604; Niwa et al., 2004, *Cancer Res.* 64: 2127-33) desde esta glucoforma son dos ejemplos de
10 manipulación genética del Fc de la IgG que mejoran la fijación entre la Fc de la IgG y el FcγR, con lo que se mejora la actividad de CCDA mediada por Ig.

Una sustitución sistémica de los aminoácidos expuestos al solvente de la región Fc de la IgG1 de humano ha generado variantes de IgG con alteraciones en la afinidad de fijación al FcγR (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-604). Cuando se compara con la IgG1 original, un subconjunto de estas variantes que implican sustituciones en Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334, o Ser298/Glu333/Lys334 por Ala muestran un incremento tanto de la afinidad de fijación por FcγR como de la actividad de CCDA (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-604; Okazaki et al., 2004, *J. Mol. Biol.* 336: 1239-49).
15

La actividad de fijación del complemento que tienen los anticuerpos (tanto la fijación de C1q como la actividad de CDC) se puede mejorar mediante sustituciones en la Lys326 y en el Glu333 (Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.* 166: 2571-2575). Las mismas sustituciones en un esqueleto de IgG2 de humano pueden convertir un isotipo de anticuerpo que se fija poco a C1q y que es gravemente deficiente en la actividad de activación por el complemento, en uno que puede tanto fijar C1q como intervenir en la CDC (Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.* 166: 2571-75). También se han aplicado otros métodos diferentes para mejorar la actividad de fijación del complemento que tienen los anticuerpos. Por ejemplo, el injerto de un trozo de cola del extremo carboxilo de 18 aminoácidos de IgM en los
20 extremos carboxilo de las IgG mejora enormemente su actividad de CDC. Esto se observa incluso con la IgG4, que no suele tener actividad de CDC detectable (Smith et al., 1995, *J. Immunol.* 154: 2226-36). De igual forma, la sustitución de la Ser444, localizada próxima al extremo carboxilo de la cadena pesada de IgG1, por Cys indujo la dimerización cola con cola de la IgG1 con una actividad de CDC que se incrementó 200 veces con respecto a la de la IgG1 monomérica (Shopes et al., 1992, *J. Immunol.* 148: 2918-22). Además, una construcción de diacuerpo biespecífico con especificidad por C1q también confiere actividad de CDC (Kontermann et al., 1997, *Nat. Biotech.* 15: 629-31).
25
30

La actividad del complemento se puede reducir con la mutación de al menos uno de los restos aminoacídicos 318, 320, y 322 de la cadena pesada en un resto que tiene una cadena lateral diferente, tal como Ala. Otros restos no iónicos sustituidos con alquilo, tal como Gly, Ile, Leu o Val, o restos no polares aromáticos tales como Phe, Tyr, Trp y Pro en lugar de cualquiera de los tres restos, también reduce o anula la fijación de C1q. Ser, Thr, Cys y Met se pueden utilizar en los restos 320 y 322, pero no en 318, para reducir o anular la actividad de fijación de C1q. La sustitución del resto 318 (Glu) por un resto polar podría modificar, pero no anular, la actividad de fijación de C1q. La sustitución del resto 297 (Asn) por Ala da lugar a la retirada de la actividad lítica, pero sólo reduce ligeramente (aproximadamente tres veces más débil) la afinidad por C1q. Esta alteración destruye el sitio de glucosilación y la presencia del glúcido que se necesita para la activación del complemento. Cualquier otra sustitución en este sitio también destruye el sitio de glucosilación. Las siguientes mutaciones y cualquier combinación de las mismas también reducen la fijación de C1q: D270A, K322A, P329A y P311S (véase la solicitud de patente internacional WO 06/036291).
35
40

La referencia a una región constante de humano incluye una región constante con cualquier alotipo natural o cualquier permutación de restos que ocupan las posiciones polimórficas en los alotipos naturales. De igual forma, podrían estar presentes hasta 1, 2, 5, o 10 mutaciones con respecto a una región constante natural de humano, tales como las indicadas más arriba para reducir la fijación al receptor de Fcγ o incrementar la fijación al FcRN.
45

D. Expresión de los anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos humanizados típicamente se producen por expresión recombinante. Las construcciones de polinucleótidos recombinantes incluyen típicamente una secuencia de control de la expresión unida operativamente a las secuencias codificantes de las cadenas del anticuerpo, que incluye regiones promotoras heterólogas o asociadas de forma natural. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar las células hospedadoras eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el hospedador adecuado, el hospedador se mantiene en las condiciones idóneas para la expresión en gran cantidad de las secuencias nucleotídicas, y la recogida y la purificación de los anticuerpos que reaccionan de manera cruzada.
50
55

Las células de mamíferos son un hospedador preferido para expresar los segmentos de nucleótidos que codifican las inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado en la técnica numerosas líneas celulares hospedadoras idóneas, capaces de secretar

proteínas heterólogas intactas, e incluyen las líneas de células CHO (p. ej., DG44), diferentes líneas de células COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas que no producen anticuerpos que incluyen Sp2/0 y NS0. Preferiblemente, las células no son humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tal como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89: 49 (1986)), y sitios necesarios de información de procesamiento, tales como los sitios de fijación del ribosoma, sitios de ajuste del ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias preferidas para el control de la expresión son los promotores procedentes de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, y similares. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148: 1149 (1992).

Una vez expresados, los anticuerpos se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos estándares de la técnica, que incluyen la purificación por HPLC, la cromatografía en columna, la electroforesis en gel y similares (véase de forma general, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

IV. Ácidos nucleicos

Se describen en la presente memoria ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las cadenas ligera y pesada humanizadas descritas más arriba. Típicamente, los ácidos nucleicos también codifican un péptido señal fusionado a las cadenas pesada y ligera maduras. Las secuencias codificantes de los ácidos nucleicos pueden estar en una unión operativa con las secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias codificantes, tales como un promotor, potenciador, sitio de fijación del ribosoma, señal de terminación de la transcripción, y similares. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden producir en forma aislada o se pueden clonar en uno o varios vectores. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar mediante, por ejemplo, la síntesis en estado sólido o por PCR de oligonucleótidos solapantes. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden juntar como un ácido nucleico contiguo, p. ej., dentro de un vector de expresión, o pueden estar separados, p. ej., cada uno clonado en su propio vector de expresión.

V. Conjugados de fármaco con anticuerpo

Los anticuerpos anti-LIV-1 pueden estar conjugados a grupos citotóxicos o citostáticos (que incluyen sales farmacéuticamente compatibles de los mismos) para formar un conjugado de fármaco con anticuerpo (CFA). Los grupos particularmente idóneos para la conjugación a anticuerpos son los agentes citotóxicos (p. ej., quimioterápicos), enzimas convertidoras de profármacos, isótopos o compuestos radiactivos, o toxinas (estos restos se denominan en su conjunto un agente terapéutico). Por ejemplo, un anticuerpo anti-LIV-1 puede estar conjugado a un agente citotóxico, tal como un quimioterápico, o a una toxina (p. ej., un agente citostático o citocida, tal como, p. ej., abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o la toxina de la difteria).

Un anticuerpo anti-LIV-1 puede estar conjugado a una enzima convertidora de profármaco. La enzima convertidora de profármaco puede estar fusionada por recombinación al anticuerpo o estar conjugada químicamente a este mediante el uso de métodos conocidos. Las enzimas convertidoras de profármacos de ejemplo son carboxipeptidasa G2, β -glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitrorreductasa y carboxipeptidasa A.

Se conocen bien las técnicas para conjugar los agentes terapéuticos a las proteínas y, en particular, a los anticuerpos (véanse, p. ej., Arnon et al., «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., «Antibodies For Drug Delivery», en *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2.^a ed. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985); «Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); y Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62: 119-58. Véase también, p. ej., la publicación PCT de patente internacional WO 89/12624).

El agente terapéutico puede estar conjugado de una manera que reduce su actividad a menos que se escinda del anticuerpo (p. ej., mediante hidrólisis, mediante degradación del anticuerpo o mediante un agente de escisión). Tal agente terapéutico está unido al anticuerpo con un conector escindible que es sensible a la escisión en el entorno intracelular de la célula cancerosa que expresa el LIV-1, pero que no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, de tal manera que el conjugado se escinde del anticuerpo cuando es internalizado por la célula cancerosa que expresa el LIV-1 (p. ej., en el medio endosómico o, por ejemplo, en virtud de la sensibilidad al pH o la sensibilidad a las proteasas, en el entorno lisosómico o en el entorno caveolar).

Típicamente, el CFA comprende una región conectora entre el agente terapéutico y el anticuerpo anti-LIV-1. Tal y como se observa más arriba, típicamente, el conector es escindible en las condiciones intracelulares, de tal manera que la escisión del conector libera el agente terapéutico del anticuerpo en el entorno intracelular (p. ej., dentro de un lisosoma o endosoma o cavéola). El conector puede ser, por ejemplo, un conector peptídico que se escinde por una enzima intracelular de tipo peptidasa o proteasa, que incluye una proteasa lisosómica o endosómica. Típicamente, el conector peptídico tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o una longitud de al menos tres aminoácidos.

Los agentes de escisión pueden incluir las catepsinas B y D y la plasmina (véase, p. ej., Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123). Los más típicos son los conectores peptídicos que son escindibles por enzimas que están presentes en las células que expresan el LIV-1. Por ejemplo, puede usarse un conector peptídico que es escindible por la catepsina-B, una proteasa dependiente de tiol, que se expresa en gran cantidad en el tejido canceroso (por ejemplo, un conector que comprende un péptido Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly). Otros ejemplos de dichos conectores se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 6.214.345. En realizaciones específicas, el conector peptídico escindible por una proteasa intracelular comprende un conector Val-Cit o un dipéptido Phe-Lys (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el conector Val-Cit). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa típicamente cuando se conjuga y la estabilidad de los conjugados en el suero es típicamente alta.

El conector escindible puede ser sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a determinados valores de pH. Típicamente, el conector sensible a pH es hidrolizables en condiciones ácidas. Por ejemplo, puede usarse un conector sensible a ácido que se puede hidrolizar en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida *cis*-aconítica, ortoéster, acetal, cetal, o similares) (véanse, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; ;Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661). Dichos conectores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables a pH por debajo de 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En determinadas realizaciones, el conector hidrolizable es un conector de tipo tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico mediante un enlace acilhidrazona (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 5.622.929)).

Otros conectores son escindibles en condiciones reductoras (p. ej., un conector de tipo disulfuro). Los conectores de tipo disulfuro incluyen los que se pueden formar mediante el uso de SATA (*N*-succinimidil-*S*-acetiltioacetato), SPDP (*N*-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato), SPDB (*N*-succinimidil-3-(2-piridiltio)butirato) y SMPT (*N*-succinimidil-oxicarbonil- α -metil- α -(2-piridiltio)tolueno), SPDB y SMPT (véanse, p. ej., Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47: 5924-5931; Wawrzynczak et al., En *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también la patente de los EE. UU. n.º 4.880.935).

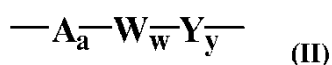
El conector puede ser también un conector de tipo malonato (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15: 1387-93), un conector de tipo maleimidobenzoilo (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10): 1299-1304), o un análogo de 3'-*N*-amida (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10): 1305-12).

El conector puede ser también un conector no escindible, tal como un conector de tipo maleimida-alquileo o maleimida-arilo que está directamente unido al agente terapéutico (p. ej., un fármaco). Un conector para fármaco activo se libera por la degradación del anticuerpo.

Típicamente, el conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, lo que significa que no más de aproximadamente el 20%, típicamente no más de aproximadamente el 15%, más típicamente no más de aproximadamente el 10%, e incluso más típicamente no más de aproximadamente el 5%, no más de aproximadamente el 3%, o no más de aproximadamente el 1%, de los conectores en una muestra del CFA están escindidos cuando el CFA aparece en un entorno extracelular (p. ej., en el plasma). Que un conector no sea sustancialmente sensible al entorno extracelular se puede determinar, por ejemplo, mediante la incubación independiente con el plasma de (a) el CFA (la «muestra de CFA») y (b) una cantidad molar igual del anticuerpo sin conjugar o del agente terapéutico (la «muestra de control») durante un periodo de tiempo predeterminado (p. ej., 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y a continuación se compara la cantidad que no se ha conjugado de anticuerpo o del agente terapéutico presente en la muestra de CFA con el presente en la muestra de control, según se mide, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

El conector también puede favorecer la internalización celular. El conector puede favorecer la internalización celular cuando está conjugado al agente terapéutico (es decir, en el medio del grupo de conector-agente terapéutico del CFA o derivado del CFA, tal y como se describe en la presente memoria). Como alternativa, el conector puede favorecer la internalización celular cuando está conjugado al agente terapéutico y al anticuerpo anti-LIV-1 (a saber, en el medio del CFA tal y como se describe en la presente memoria).

Se pueden utilizar numerosos conectores con las presentes composiciones, tal y como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2004-010957 y tienen la forma



en la que:

-A- es una unidad de elongación;

a es 0 o 1;

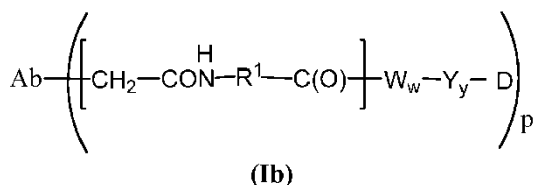
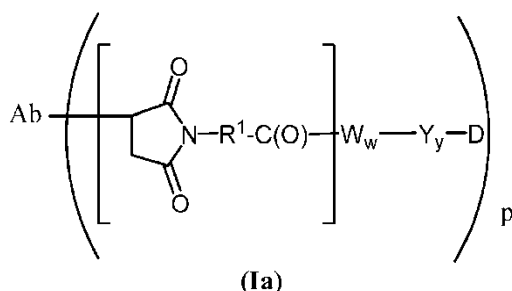
cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

w es independientemente un número entero que varía de 0 a 12;

-Y- es una unidad espaciadora; e

y es 0, 1 o 2.

- 5 Las unidades de elongación representativas se describen entre los corchetes de las fórmulas (Ia) y (Ib; véase más abajo), en donde A-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal y como se han definido más arriba, y R¹ se selecciona de -alquileo(C₁-C₁₀)-, -carbociclo(C₃-C₈)-, -O-(alquilo(C₁-C₈))-, -arileno-, -alquileo(C₁-C₁₀)-arileno-, -arileno-
- 10 -alquileo(C₁-C₁₀)-, -alquileo(C₁-C₁₀)-(carbociclo(C₃-C₈))-, -(carbociclo(C₃-C₈))-alquileo(C₁-C₁₀)-, -heterociclo(C₃-C₈)-, -alquileo(C₁-C₁₀)-(heterociclo(C₃-C₈))-, -(heterociclo(C₃-C₈))-alquileo(C₁-C₁₀)-, -(CH₂CH₂O)_r- y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, y r es un entero que varía de 1 a 10. Ab es anticuerpo.



- 15 La carga de fármaco se representa mediante p, el número de moléculas de fármaco-conector por anticuerpo. Según el contexto, p puede representar el número medio de moléculas de fármaco-conector por anticuerpo, que también se denomina la carga media de fármaco. P varía de 1 a 20 y es preferiblemente de 1 a 8. En algunas realizaciones preferidas, cuando p representa la carga media de fármaco, p varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En algunas realizaciones, p es aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5. El número promedio de fármacos por anticuerpo en una preparación podría caracterizarse por medios convencionales, tales como espectroscopia de masas, ensayo ELISA y HPLC.

- 20 La unidad de aminoácido (-W-), si está presente, conecta la unidad de elongación (-A-) con la unidad espaciadora (-Y-) si la unidad espaciadora está presente, y conecta la unidad de elongación al agente citotóxico o citostático (unidad de fármaco; D) si la unidad espaciadora está ausente.

Si está presente, W_w- es preferiblemente una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido.

- 25 La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, conecta una unidad de aminoácido a la unidad de fármaco. Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autodestructivas y no autodestructivas. Una unidad espaciadora no autodestructiva es una en la que parte o toda la unidad espaciadora permanece fijada a la unidad de fármaco después de la escisión enzimática de una unidad de aminoácido desde el conjugado anticuerpo anti-LIV-1-conector-fármaco o el compuesto fármaco-conector. Ejemplos de unidades espaciadoras no autodestructivas incluyen una
- 30 unidad espaciadora (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina. Cuando un conjugado anticuerpo anti-LIV-1-conector-fármaco que contiene una unidad espaciadora glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina experimenta la escisión enzimática mediante una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, se escinde de L-A_a-W_w- un grupo glicina-glicina-fármaco o un grupo glicina-fármaco. Para liberar el fármaco, debe tener lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro
- 35 de la célula diana para escindir el enlace entra la glicina y la unidad de fármaco.

Como alternativa, un conjugado de fármaco con el anticuerpo anti-LIV-1 que contiene una unidad espaciadora autodestructiva puede liberar el fármaco (D) sin necesidad de añadir una etapa de hidrólisis. En algunas de estas realizaciones, -Y- es una unidad de alcohol *p*-aminobencílico (PAB) que está unida a -W_w- a través del átomo de nitrógeno del grupo PAB y que está conectada directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter.

- 40 Otros ejemplos de espaciadores autodestructivos incluyen, pero no están limitados a ellos, compuestos aromáticos que son electrónicamente equivalentes al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase Hay et al., 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2237 para ejemplos) y *orto*- o *para*-aminobencilacetales. Pueden

usarse espaciadores que experimentan una ciclación fácil después de la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al., 1995, *Chemistry Biology* 2: 223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos apropiadamente (Storm et al., 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94: 5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry et al., 1990, *J. Org. Chem.* 55: 5867). La eliminación de los fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición α de la glicina (Kingsbury, et al., 1984, *J. Med. Chem.* 27: 1447) son también ejemplos de estrategias de espaciador autodestructivo que se pueden aplicar a los conjugados anticuerpo anti-LIV-1-conector-fármaco. Como alternativa, la unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificada, que se puede utilizar para incorporar más fármacos.

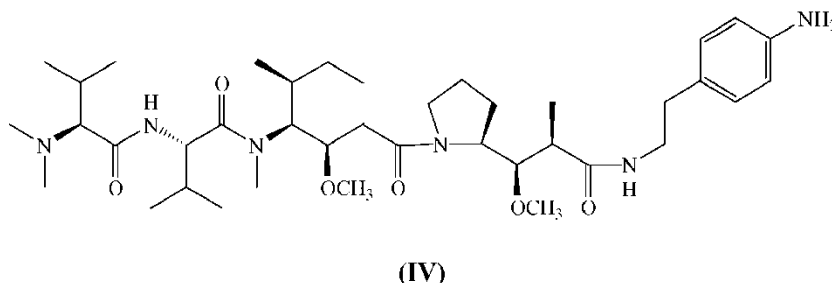
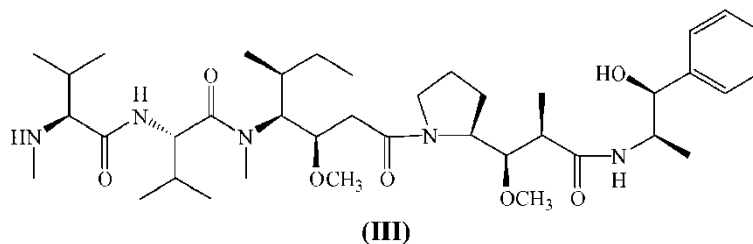
Las clases útiles de agentes citotóxicos para conjugarse a los anticuerpos anti-LIV-1 incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, agentes que se fijan al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, sensibilizadores de quimioterapia o similares. Otras clases de ejemplo de agentes citotóxicos incluyen antraciclinas, auristatinas, camptotecinas, duocarmicinas, etopósidos, maitansinoides y alcaloides vinca. Algunos agentes citotóxicos de ejemplo incluyen auristatinas (p. ej., auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), fijadores del surco menor del ADN (p. ej., enodiíno y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (p. ej., paclitaxel y docetaxel), alcaloides de vinca, doxorubicina, morfolino-doxorubicina y cianomorfolino-doxorubicina.

El agente citotóxico puede ser un quimioterápico tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalán, alcaloides de vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. El agente también puede ser un análogo de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, un análogo de dolastatina 10, rizoxina o palitoxina.

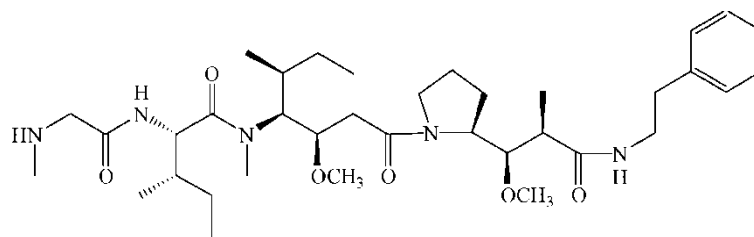
El agente citotóxico también puede ser una auristatina. La auristatina puede ser un derivado de auristatina E, por ejemplo, un éster formado entre la auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con el ácido paraacetilbenzoico o con el ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen AFP, MMAF, y MMAE. La síntesis y la estructura de diferentes auristatinas se describe en, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. US 2005-0238649 y US 2006-0074008.

El agente citotóxico puede ser un agente que se fija al surco menor del ADN (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. n.º 6.130.237). Por ejemplo, el agente que se fija al surco menor puede ser un compuesto de CBI o un enodiíno (p. ej., caliqueamicina).

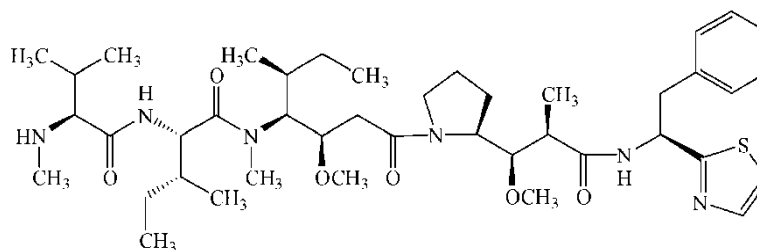
El agente citotóxico o citostático puede ser un agente antitubulina. Ejemplos de agentes antitubulina incluyen taxanos (p. ej., Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de vinca (p. ej., vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y auristatinas (p. ej., auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB) (las auristatinas de ejemplo se muestran a continuación en las fórmulas III a XIII). Otros agentes antitubulina idóneos incluyen, por ejemplo, derivados de bacatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cematotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida, y eleuterobina.



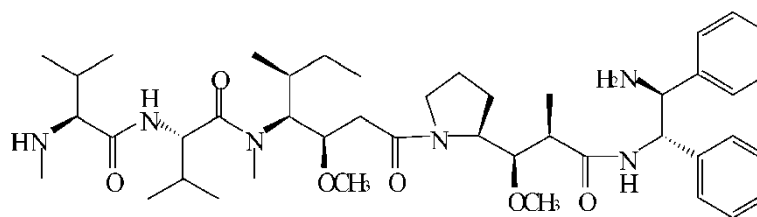
35



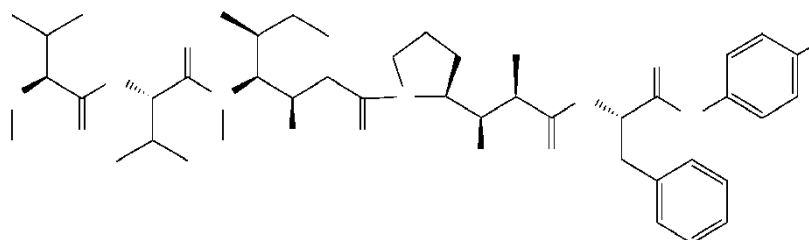
(V)



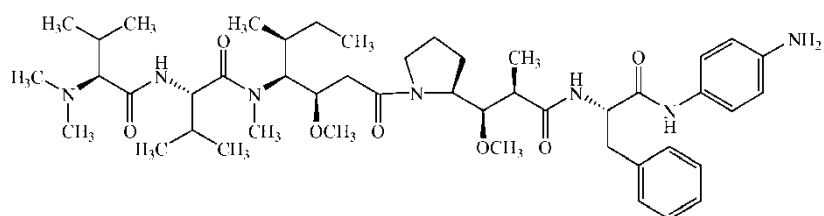
(VI)



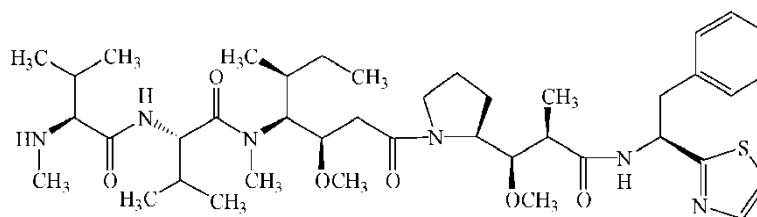
(VII)



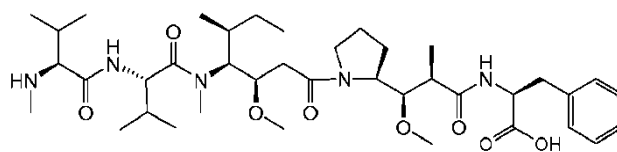
(VIII)



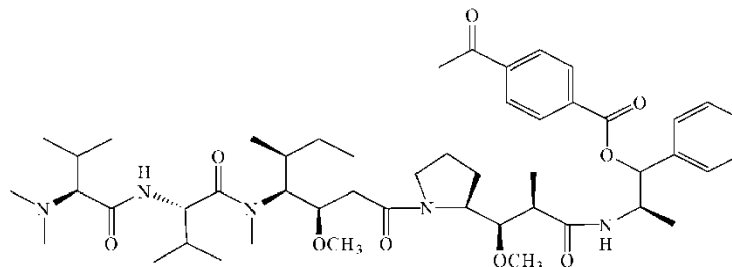
(IX)



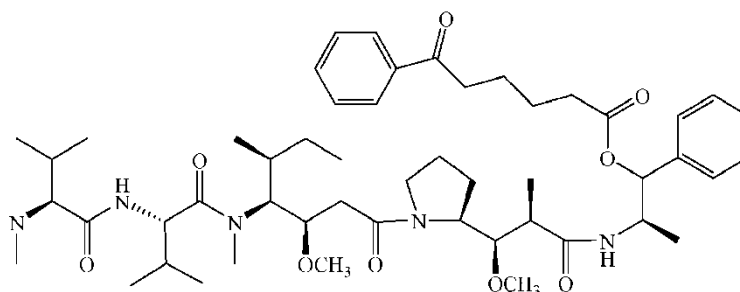
(X)



(XI)



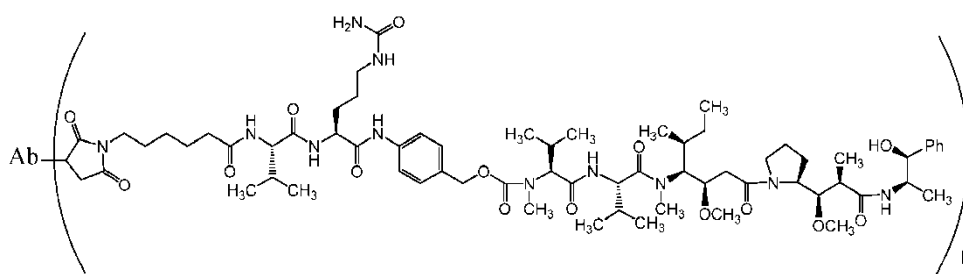
(XII)



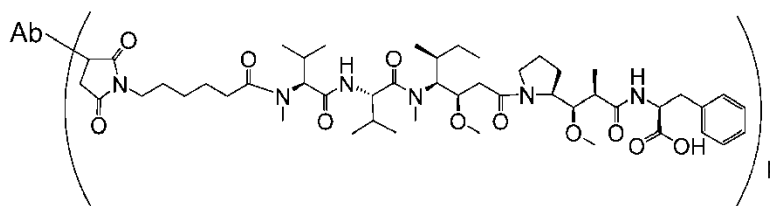
(XIII)

5 El agente citotóxico puede ser un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, el maitansinoide puede ser una maitansina o un conector de fármaco que contiene maitansina, tal como DM-1 o DM-4 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari et al., 1992, *Cancer Res.* 52: 127-131).

Los conjugados de fármaco con anticuerpo de ejemplo incluyen anticuerpos conjugados a los fármacos vcMMAE y mcMMAF como los que vienen a continuación, en donde p y Ab son como está descrito más arriba en la presente memoria:



10 vcMMAE



mcMMAF

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

VI. Otros anticuerpos contra LIV-1

- Al igual que las formas humanizadas de los anticuerpos BR2-14a y BR2-22a explicados más arriba, otros anticuerpos que se fijan a un dominio extracelular de LIV-1 se pueden utilizar en algunos de los métodos descritos en la presente memoria, en particular para el tratamiento de los cánceres de mama triple negativo. En la patente de los EE. UU. US 20080175839 se describe una colección de anticuerpos de ratón frente a LIV-1. Estos anticuerpos incluyen 1.1F10, 1.7A4, BR2-10b, BR2-11a, BR2-13a, BR2-14a, BR2-15a, BR2-16a, BR2-17a, BR2-18a, BR2-19a, BR2-20a, BR2-21a, BR2-22a, BR2-23a, BR2-24a y BR2-25a, de los cuales se prefieren el BR2-19a producido por el hibridoma con n.º de acceso de la ATCC PTA-5706 o el BR2-23a producido por el hibridoma con n.º de acceso de la ATCC PTA-5707, además de BR2-14a y BR2-22a. Las formas humanizadas, químicas o remodeladas de estos anticuerpos se pueden fabricar mediante los métodos convencionales que se resumen a continuación.
- Otros anticuerpos frente a LIV-1 se pueden fabricar *de novo* mediante inmunización con el LIV-1 o uno o varios dominios extracelulares del mismo. La producción de otros anticuerpos monoclonales no humanos, p. ej., murino, de conejillo de Indias, de primate, de conejo o de rata, contra un inmunógeno se puede realizar tal y como se describe en Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988). Tal inmunógeno se puede obtener de una fuente natural, mediante síntesis de péptidos o mediante expresión recombinante.
- Se pueden fabricar formas humanizadas, químicas o remodeladas de anticuerpos no humanos. La metodología general para producir anticuerpos humanizados se describe en Queen, patentes de los EE. UU. US 5.530.101 y 5.585.089; Winter, US 5.225.539; Carter, US 6.407.213; Adair, US 5.859.205; y Foote, US 6.881.557. Un anticuerpo químico es un anticuerpo en el que las regiones variables maduras de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo no humano (p. ej., de ratón) se combinan con regiones constantes de las cadenas ligera y pesada de un humano. Tales anticuerpos conservan de forma sustancial o total la especificidad de fijación del anticuerpo de ratón y tienen aproximadamente dos terceras partes de secuencia humana. Un anticuerpo remodelado es un tipo de anticuerpo humanizado que conserva algunas y normalmente todas las CDR y algunos de los restos flanqueantes de la región variable no humana de un anticuerpo no humano, pero sustituye otros restos flanqueantes de la región variable que podrían contribuir a ser epítomos de linfocitos B o linfocitos T, por ejemplo, restos expuestos (Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489, 1991) por restos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo de humano. El resultado es un anticuerpo en el que las CDR son completa o sustancialmente de un anticuerpo no humano y las secuencias flanqueantes de la región variable del anticuerpo no humano se hacen de tipo más humano mediante las sustituciones.
- Se pueden dar a conocer anticuerpos humanos frente a LIV-1 mediante una serie de técnicas descritas más adelante. Los métodos para producir anticuerpos humanos incluyen el método de trioma de Oestberg et al., *Hybridoma* 2: 361-367 (1983); Oestberg, patente de los EE. UU. n.º 4.634.664; y Engleman et al., patente de los EE. UU. 4.634.666; uso de ratones transgénicos que incluyen genes de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Lonberg et al., solicitud de patente internacional WO 93/12227 (1993); patentes de los EE. UU. n.ºs 5.877.397, 5.874.299, 5.814.318, 5.789.650, 5.770.429, 5.661.016, 5.633.425, 5.625.126, 5.569.825, 5.545.806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, solicitud de patente internacional WO 91/10741 (1991) y métodos de presentación en fagos (véase, p. ej., Dower et al., solicitud de patente internacional WO 91/17271 y McCafferty et al., solicitud de patente internacional WO 92/01047, patentes de los EE. UU. n.ºs 5.877.218, 5.871.907, 5.858.657, 5.837.242, 5.733.743 y 5.565.332.
- Cualquiera de los anticuerpos se puede seleccionar por tener especificidad por el mismo epítomo, o por un epítomo solapante, que un anticuerpo de ejemplo, tal como el anticuerpo BR2-14a, mediante un ensayo de fijación competitiva o de otra manera.

VII. Aplicaciones terapéuticas

- Los anticuerpos humanizados de la invención, solos o como conjugados de un fármaco al anticuerpo anti-LIV-1 de los mismos, se pueden utilizar para tratar el cáncer. Algunos de tales cánceres muestran una cantidad detectable de LIV-1 medida bien como cantidad de proteína (p. ej., mediante inmunoensayo con uno de los anticuerpos de ejemplo) o bien como cantidad de ARNm. Algunos de tales cánceres muestran una gran cantidad de LIV-1 con respecto al tejido no canceroso del mismo tipo, preferiblemente del mismo paciente. Una cantidad de ejemplo de LIV-1 en las células cancerosas que se prestan al tratamiento es de 5.000 a 150.000 moléculas de LIV-1 por célula, aunque se pueden tratar cantidades más altas o más bajas. Opcionalmente, se mide una cantidad de LIV-1 en un cáncer antes de realizar el tratamiento.

- Los ejemplos de cánceres asociados a la expresión de LIV-1 y que se prestan al tratamiento incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de riñón y carcinomas de células escamosas (p. ej., de vejiga, cabeza, cuello y pulmón), cánceres de piel, p. ej., melanoma, carcinoma celular microcítico o carcinoide pulmonar. El tratamiento se puede aplicar a los pacientes que tienen tumores primarios o metastásicos de estas clases. El tratamiento también se puede aplicar a los pacientes que son resistentes a los tratamientos convencionales (p. ej., hormonas, tamoxifeno, herceptina) o que han tenido una recidiva después de haber respondido a tales tratamientos. Los métodos también se pueden utilizar en los cánceres de mama triple negativo. Un cáncer de mama triple negativo es un término de la técnica para un cáncer en los que no se detectan receptores de estrógenos ni de progesterona y que carecen de la sobreexpresión de HER2/neu cuando se tiñen con un anticuerpo contra cualquiera de estos

receptores, tal y como se describe en los ejemplos. La tinción se puede realizar con respecto a un anticuerpo de control irrelevante y la falta de expresión se demuestra por un nivel de fondo de tinción al mismo nivel o uno similar que el del control dentro del error experimental. Asimismo, la ausencia de sobreexpresión se demuestra por una tinción al mismo nivel o a uno similar dentro de un error experimental del tejido de mama no canceroso, preferiblemente obtenido de la misma paciente. Como alternativa o adicionalmente, los cánceres de mama triple negativo se caracterizan por la incapacidad para responder a las hormonas que interactúan con estos receptores, comportamiento agresivo y patrón bien definido de metástasis.

Los anticuerpos hLIV14 se pueden utilizar para tratar los cánceres que expresan el LIV-1. En una realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de mama que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de próstata que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un melanoma que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de ovario que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de endometrio que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de cuello uterino que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de hígado que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de estómago que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de riñón que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con carcinomas de células escamosas que expresan el LIV-1 (p. ej., cáncer de vejiga, cabeza, cuello y pulmón). En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de mama que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de piel que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un carcinoma pulmonar microcítico o un carcinoma pulmonar que expresa el LIV-1.

Los anticuerpos hLIV22 se pueden utilizar para tratar cánceres que expresan el LIV-1. En una realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de mama que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de próstata que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un melanoma que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de ovario que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de endometrio que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de cuello uterino que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de hígado que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de estómago que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de riñón que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con carcinomas de células escamosas que expresan el LIV-1 (p. ej., cáncer de vejiga, cabeza, cuello y pulmón). En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de mama que expresa el LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de piel que expresa el LIV-1. En otra realización, un anticuerpo hLIV22 se utiliza para tratar a un sujeto con un carcinoma pulmonar microcítico o un carcinoma pulmonar que expresa el LIV-1.

Esta solicitud da a conocer la primera descripción de que la proteína LIV-1 se expresa en la superficie de las células de melanoma. Así pues, los anticuerpos que se fijan a LIV-1 se pueden utilizar para tratar pacientes que están afectados con melanomas que expresan el LIV-1. Tales anticuerpos incluyen los anticuerpos descritos en la presente memoria, p. ej., hLIV14 y hLIV22, pero no se limita a los anticuerpos descritos en la presente memoria.

Los anticuerpos humanizados, solos o como conjugados de los mismos, se administran en un tratamiento eficaz que significa una dosificación, vía de administración y frecuencia de administración que retrasa el comienzo, reduce la intensidad, inhibe el posterior deterioro y/o mejora al menos un signo o síntoma de cáncer. Si un paciente ya padece cáncer, se puede decir que el tratamiento es un tratamiento terapéuticamente eficaz. Si el paciente se encuentra en riesgo elevado de cáncer con respecto a la población general, pero aún no experimenta síntomas, se puede decir que el tratamiento es un tratamiento profilácticamente eficaz. En algunos casos, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede observar en un paciente concreto con respecto a los controles históricos o a la experiencia pasada en el mismo paciente. En otros casos, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede demostrar en un ensayo preclínico o clínico en una población de pacientes tratados con respecto a una población de control de pacientes sin tratar.

Las dosis de ejemplo para un anticuerpo monoclonal son de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg de la masa corporal del paciente, más típicamente de 1 mg/kg a 30 mg/kg, de 1 mg/kg a 20 mg/kg, de 1 mg/kg a 15 mg/kg, de 1 mg/kg a 12 mg/kg o de 1 mg/kg a 10 mg/kg, o de 2 mg/kg a 30 mg/kg, de 2 mg/kg a 20 mg/kg, de 2 mg/kg a 15 mg/kg, de 2 mg/kg a 12 mg/kg, o de 2 mg/kg a 10 mg/kg, o de 3 mg/kg a 30 mg/kg, de 3 mg/kg a 20 mg/kg, de 3 mg/kg a 15 mg/kg, de 3 mg/kg a 12 mg/kg, o de 3 mg/kg a 10 mg/kg. Las dosis de ejemplo para un anticuerpo monoclonal o conjugados de fármaco con dicho anticuerpo son de 1 mg/kg a 7,5 mg/kg, o de 2 mg/kg a 7,5 mg/kg o de 3 mg/kg a 7,5 mg/kg de la masa corporal del sujeto, o de 0,1 a 20, o de 0,5 a 5 mg/kg de masa corporal (p. ej., 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg) o de 10 a 1.500 o de 200 a 1.500 mg como una dosis fija. En algunos métodos, al paciente se le administra una dosis de al menos 1,5 mg/kg, al menos 2 mg/kg o al menos 3 mg/kg, que se le administran una vez cada tres semanas o más. La dosis depende de la frecuencia de administración, afección del paciente y respuesta al

tratamiento previo, si lo hay, tanto si el tratamiento es profiláctico como terapéutico, y si el trastorno es agudo o crónico, entre otros factores.

5 La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. La administración también se puede localizar directamente en un tumor. Se prefiere la administración en la circulación sistémica mediante administración intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, mediante infusión durante un periodo tal como de 30 a 90 min, o mediante una única inyección en embolada.

10 La frecuencia de administración depende de la semivida del anticuerpo o del conjugado en el torrente circulatorio, la afección del paciente y la vía de administración, entre otros factores. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral o a intervalos irregulares en respuesta a los cambios de la afección del paciente o de la progresión del cáncer que se está tratando. Una frecuencia de ejemplo para la administración intravenosa está entre dos veces a la semana y trimestralmente a lo largo de un ciclo de tratamiento continuo, aunque también es posible una dosis más o menos frecuente. Otras frecuencias de ejemplo para la administración intravenosa son entre semanal o cada cuatro semanas a lo largo de un ciclo continuo de tratamiento, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Para la administración subcutánea, una frecuencia de dosis de ejemplo es diaria o mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.

15 El número de dosis administradas depende de la naturaleza del cáncer (p. ej., si presenta síntomas agudos o crónicos) y la respuesta del trastorno al tratamiento. Para los trastornos agudos o los empeoramientos agudos de un trastorno crónico son a menudo suficientes entre 1 y 10 dosis. Algunas veces es suficiente una única dosis en embolada, opcionalmente en forma dividida, para un trastorno agudo o el empeoramiento agudo de un trastorno crónico. El tratamiento se puede repetir por la recidiva de un trastorno agudo o el empeoramiento agudo. Para los trastornos crónicos, se puede administrar un anticuerpo a intervalos regulares, p. ej., cada semana, quincena, mes, trimestre, semestre, durante al menos 1, 5 o 10 años, o la vida del paciente.

20 Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral son preferiblemente estériles y sustancialmente isotónicas, y se fabrican siguiendo las normas de correcta fabricación. Las composiciones farmacéuticas se pueden dar a conocer en una forma farmacéutica unitaria (es decir, la dosis para una única administración). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con uno o varios vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la vía de administración elegida. Para la inyección, los anticuerpos se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como la solución de Hank, la solución de Ringer, o solución salina fisiológica o tampón acetato (para reducir las molestias en el sitio de inyección). La solución puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para la reconstitución con un vehículo idóneo, p. ej., agua estéril apirógena, antes del uso. La concentración del anticuerpo en una formulación líquida puede ser, p. ej., de 1 a 100 mg/ml, tal como 10 mg/ml.

25 El tratamiento con los anticuerpos de la invención se puede combinar con quimioterapia, irradiación, tratamiento con células madre, cirugía y otros tratamientos eficaces frente al trastorno a tratar. Las clases útiles de agentes adicionales que se pueden administrar con los anticuerpos humanizados frente a LIV-1 incluyen, por ejemplo, anticuerpos contra otros receptores expresados en las células cancerosas, agentes antitubulina (p. ej., auristatinas), agentes que se fijan al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, alquilantes (p. ej., complejos de platino, tales como *cis*-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de la quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropinas, nitrosureas, platinoles, compuestos de preformación, antimetabolitos de purinas, puromicinas, sensibilizantes de la irradiación, esteroides, taxanos, inhibidores de las topoisomerasas, alcaloides de vinca y similares.

35 El tratamiento con el anticuerpo anti-LIV-1 humanizado, opcionalmente en combinación con cualquiera de los demás agentes o tratamientos descritos más arriba, solos o como un conjugado de fármaco con anticuerpo, pueden incrementar la mediana de la supervivencia sin progresión o del tiempo de supervivencia global de los pacientes con tumores (p. ej., mama, próstata, melanoma), en especial cuando recidivan o son insensibles, hasta al menos el 30% o el 40%, pero preferiblemente el 50%, 60% al 70% o incluso el 100% o más, en comparación con el mismo tratamiento (p. ej., quimioterapia), pero sin un anticuerpo anti-LIV-1 solo o como conjugado. Además, o como alternativa, el tratamiento (p. ej., quimioterapia estándar) que incluye el anticuerpo anti-LIV-1 solo o como un conjugado puede incrementar la tasa de respuesta completa, la tasa de respuesta parcial o la tasa de respuesta objetiva (completa + parcial) de los pacientes con tumores hasta al menos el 30% o el 40%, pero preferiblemente el 50%, 60% al 70% o incluso el 100%, en comparación con el mismo tratamiento (p. ej., quimioterapia), pero sin el anticuerpo anti-LIV-1.

40 Típicamente, en un ensayo clínico (p. ej., un ensayo de fase II, fase II/III o fase III), los incrementos arriba mencionados de la mediana de la supervivencia sin progresión y/o la tasa de respuesta de los pacientes tratados con tratamiento estándar más el anticuerpo anti-LIV-1 humanizado, con respecto al grupo de control de los pacientes que reciben el tratamiento estándar solo (o más placebo) son estadísticamente significativos, por ejemplo, a un nivel de $p = 0,05$ o $0,01$ o incluso $0,001$. La tasa de respuestas completas o parciales se determina mediante criterios

objetivos que se utilizan corrientemente en los ensayos clínicos para el cáncer, p. ej., como se recoge o acepta en el Instituto Nacional del Cáncer y/o la Agencia Estadounidense del Medicamento (FDA).

VIII. Otras aplicaciones

5 Los anticuerpos humanizados anti-LIV-1 se pueden utilizar para detectar el LIV-1 en el contexto del diagnóstico clínico o del tratamiento o para la investigación. La expresión de LIV-1 en un cáncer proporciona una indicación de que el cáncer se presta al tratamiento con los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos también se pueden vender como reactivos de investigación para los laboratorios de investigación para detectar células portadoras de LIV-1 y su respuesta a diferentes estímulos. En tales usos, los anticuerpos monoclonales pueden estar marcados con moléculas fluorescentes, moléculas marcadas por el espín, enzimas y radioisótopos, y se pueden dar a conocer en forma de un kit con todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo de LIV-1. Los anticuerpos descritos en la presente memoria, BR2-14a, BR2-22a y las versiones humanizadas de los mismos, p. ej., hLIV14 y hLIV22, se pueden utilizar para detectar la expresión de la proteína LIV-1 y determinar si un cáncer se presta al tratamiento con los CFA contra LIV-1. Como ejemplo, BR2-14a, BR2-22a y las versiones humanizadas de los mismos, p. ej., hLIV14 y hLIV22, se pueden utilizar para detectar la expresión de LIV-1 en las células de cáncer de mama, células de melanoma, células de cáncer de cuello uterino o células del cáncer de próstata. Los anticuerpos también se pueden utilizar para purificar el LIV-1, p. ej., por cromatografía de afinidad.

IX. LIV-1 de macaco cangrejero

En la presente memoria se describe una secuencia de aminoácidos para el LIV-1 de los macacos cangrejeros (CY-LIV-1) en la SEQ ID n.º 85 con o sin un péptido señal, que ocupa aproximadamente los restos 1 a 28 de la SEQ ID n.º 85, así como los ácidos nucleicos que codifican esas secuencias aminoacídicas. Las variantes que difieren en hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, deleciones o inserciones también están incluidas, siempre y cuando las variantes de CY no incluyan una secuencia natural del LIV-1 de humano. De manera análoga al LIV-1 de humano, la referencia a CY-LIV-1 hace referencia a al menos un dominio extracelular de la proteína y normalmente a la proteína completa que no contiene un péptido señal escindible (los aminoácidos 1 a 28). La descripción da a conocer adicionalmente anticuerpos que se fijan específicamente a la SEQ ID n.º 85 con o sin fijación específica al LIV-1 de humano (a saber, fijación al LIV-1 de humano a nivel del anticuerpo irrelevante de control negativo). La descripción da a conocer adicionalmente anticuerpos que se fijan preferiblemente al CY-LIV-1 mejor que al LIV-1 de humano y viceversa. La fijación preferencial hace referencia a una asociación mayor, por encima del error experimental, y preferiblemente al menos 2, 3 o 4 veces más alta. La descripción da a conocer adicionalmente anticuerpos que muestran el mismo perfil de fijación al LIV-1 de humano y al CY-LIV-1 dentro del error experimental que cualquiera de los anticuerpos de ejemplo que se describen a continuación. La descripción da a conocer adicionalmente métodos para analizar la fijación de un anticuerpo al CY-LIV-1. Tales métodos implican poner en contacto un anticuerpo con CY-LIV-1, determinar si el anticuerpo se fija específicamente a CY-LIV-1 y opcionalmente determinar una medición de la fuerza de la fijación, tal como una constante de asociación.

35 Ejemplos

I. Humanización de BR2-14a

Materiales

Las líneas celulares descritas en los ejemplos siguientes se mantuvieron en cultivo de acuerdo con las condiciones especificadas por la American Type Culture Collection (ATCC), el National Cancer Institute (NCI) o el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania (DMSZ). Los reactantes para el cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA.) u otros proveedores.

Metodologías:

Ensayos de fijación a saturación

45 En placas de 96 pocillos con fondo en v se distribuyeron por pocillo alícuotas de 1×10^5 células que expresan el antígeno (tanto células MCF7 (ATCC) que expresan el LIV-1 de humano, como una línea celular CHO transfectada que expresa el LIV-1 de humano, o bien una línea celular CHO transfectada que expresa el LIV-1 de macaco cangrejero). El Acm murino frente a LIV-1 marcado con AlexaFluor-647, p. ej., BR2-14a, se añadió en concentraciones que iban de 0,66 pM a 690 nM, y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se sedimentaron las células y se lavaron 3 veces con PBS/SAB. A continuación, se sedimentaron las células y se resuspendieron en 125 μ l de PBS/SAB. La fluorescencia se analizó por citometría de flujo, que utiliza el porcentaje de la señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje fijado y para calcular posteriormente la Kd aparente.

Ensayos de fijación competitiva

55 Se distribuyó en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en hielo con fondo en v una alícuota de 1×10^5 células CHO que expresan el LIV-1 recombinante de humano en PBS/SAB. Las células se incubaron durante 1 hora con el Acm murino original frente a LIV-1 marcado con AlexaFluor-647 (AF) a 5 nM y concentraciones crecientes (de 0,038

nM a 600 nM) del Acm humanizado contra LIV-1 sin marcar, combinaciones de cadenas ligeras humanizadas LA-LF y de cadenas pesadas humanizadas HA-HE. Se sedimentaron las células y se lavaron 3 veces con PBS/SAB. A continuación, se sedimentaron las células y se resuspendieron en 125 µl de PBS/SAB. La fluorescencia se analizó por citometría de flujo, utilizando el porcentaje de la señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje del Acm murino marcado frente a LIV-1 que se ha fijado y posteriormente extrapolar la CE50 mediante el ajuste de los datos a una curva sigmoidea de respuesta a la dosis con pendiente variable.

Se distribuyó en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en hielo con fondo en v una alícuota de 1×10^5 células MCF7 que expresan el LIV-1 en PBS/SAB. Las células se incubaron durante 1 hora con el Acm murino frente a LIV-1 marcado con AlexaFluor-647 a 5 nM y concentraciones crecientes (de 0,038 nM a 600 nM) del Acm humanizado frente a LIV-1 sin marcar, combinaciones de cadenas ligeras humanizadas LA-LF y de cadenas pesadas humanizadas HA-HE. Se sedimentaron las células y se lavaron 3 veces con PBS. A continuación, se sedimentaron las células y se resuspendieron en 125 µl de PBS/SAB. La fluorescencia se analizó por citometría de flujo, utilizando el porcentaje de la señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje del Acm murino marcado frente a LIV-1 que se ha fijado y posteriormente extrapolar la CE50 mediante el ajuste los datos a una curva sigmoidea de respuesta a la dosis con una pendiente variable.

Se distribuyó en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en hielo con fondo en v una alícuota de 1×10^5 células CHO que expresan el LIV-1 recombinante de macaco cangrejero en PBS. Las células se incubaron durante 1 hora con el Acm murino frente a LIV-1 marcado con AlexaFluor-647 a 5 nM y concentraciones crecientes (de 0,038 nM a 600 nM) del Acm humanizado frente a LIV-1 sin marcar, combinaciones de cadenas ligeras humanizadas LA-LF y de cadenas pesadas humanizadas HA-HE. Se sedimentaron las células y se lavaron 3 veces con PBS. A continuación, se sedimentaron las células y se resuspendieron en 125 µl de PBS/SAB. La fluorescencia se analizó por citometría de flujo, utilizando el porcentaje de la señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje del Acm murino marcado contra LIV-1 que se fijó y posteriormente extrapolar la CE50 ajustando los datos a una curva sigmoidea de respuesta a la dosis con una pendiente variable.

25 **Análisis cuantitativo por citometría de flujo**

La cuantificación del número de copias de LIV-1 en la superficie de las células se determinó con el Acm murino frente a LIV-1 como anticuerpo primario y el ensayo indirecto por citometría de flujo DAKO QiFiKit según describe el fabricante (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca), y se evaluó con un citómetro de flujo Becton Dickinson FACS@can.

Ensayo de citotoxicidad

30 Se incubaron las células tumorales con conjugados de fármaco con el anticuerpo contra LIV-1 durante 96 a 144 horas a 37 °C. Un CFA que no se fija (H00) se utilizó como un control negativo. Se midió la viabilidad celular con resazurina (Sigma) a la concentración final de 50 µM. Las células se incubaron durante cuatro a seis horas a 37 °C. La señal fluorescente se midió en un lector de fluorescencia de placas Fusion HT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los resultados se devuelven como CI_{50} , la concentración de compuesto necesaria para producir un 50% de reducción de la viabilidad en comparación con las células tratadas con vehículo (control = 100%).

Producción de conjugados de fármaco con anticuerpo

40 Los conjugados de fármaco con anticuerpo de los anticuerpos contra LIV-1 se prepararon como se describe en la patente de los EE. UU. US 20050238649. Los conectores de fármacos vcMMAE (también denominado 1006) y mcMMAF (denominado 1269) se describen en la patente de los EE. UU. US 20050238649. La preparación de los mutantes de cisteína de los anticuerpos IgG1 se describe de forma general en las patentes de los EE. UU. US 20100158919, US 20050238649 y US 20100158919.

Producción del Acm anti-LIV-1 sin fucosilar

45 Una línea de células CHO DG44 que produce el anticuerpo monoclonal humanizado anti-LIV-1 de tipo IgG1, el Acm HBLB (hLIV-14), se cultivó a $3,0 \times 10^5$ células por mililitro en 30 ml del medio de cultivo de CHO a 37 °C, CO₂ al 5% y con agitación a 100 rpm en un matraz para agitación de 125 ml. El medio se complementó con el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), penicilina, estreptomina y peracetato de 2-fluorofucosa a 65 µM (SGD-2084) (véase la patente de los EE. UU. US 20090317869). A los cultivos se les inoculó el día 3 un volumen del 2% de los medios de alimentación. El día cuatro, el cultivo se dividió 1:4 en medio de cultivo recién preparado. A los cultivos se les inoculó un volumen del 6% del medio de alimentación para producción los días 5, 7, 9 y 10. Los medios acondicionados se recogieron el día 13 al hacer pasar el cultivo a través de un filtro de 0,2 µm. La purificación del anticuerpo se realizó al aplicar el medio acondicionado a una columna con proteína A preequilibrada con solución salina tamponada con fosfato a 1X (PBS), pH 7,4.

55 Después de lavar la columna con 20 volúmenes de la columna de PBS a 1X, los anticuerpos se eluyeron con el volumen de 5 columnas del tampón de elución de IgG Immunopure (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Se le añadió un 10% del volumen de Tris a 1 M, pH 8,0, a la fracción eluida. La muestra se dializó durante una noche en PBS a 1x.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)

La actividad de CCDA se midió con el ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr . Brevemente, las células tumorales destinatarias MCF-7 se marcaron con 100 μCi de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$, se lavaron y se preincubaron con los anticuerpos problema antes de añadir las células efectoras (linfocitos citolíticos naturales, NK). Los linfocitos citolíticos naturales (CD16⁺ CD56⁺) se prepararon a partir de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) no adheridas que se obtienen de donantes normales FcyRIIIA 158V/V (Lifeblood, Memphis, TN) con perlas inmunomagnéticas (EasySep, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Los linfocitos citolíticos naturales viables se añadieron a las células diana con una relación efector:célula diana de 10:1. En este ensayo se utilizó como control negativo la IgG1k de humano (Ansell, Bayport, MN). Después de 4 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se secaron durante una noche en placas Luma. A continuación, la radiación γ emitida desde las células MCF-7 lisadas se detectó con el contador de luminiscencia y centelleo de microplacas TopCount (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). La actividad de CCDA se describe como el % de lisis específica.

Estudio de la actividad *in vivo*

A los ratones atímicos (*nu/nu*) (7-8 animales/grupo) se les implantaron células tumorales que se hicieron crecer en cultivo: MCF-7 del NCI (5×10^6 células en matrigel al 25%), PC3 de la ATCC ($2,5 \times 10^6$ células en matrigel al 25%) y PC3 del DSMZ (5×10^5 en matrigel al 25%). Para el crecimiento *in vivo* de las células MCF-7, las ratonas hembra recibieron también el suplemento de estrógenos mediante la implantación de una microesfera de estrógenos de liberación lenta (liberación durante 90 días). La dosificación con CFA contra LIV-1 humanizado o bien quimérico, o el CFA de control sin fijación (3 mg/kg) comenzó cuando los tumores alcanzaron los 100 mm³ (cada 4 días \times 4 inyecciones intraperitoneales). El volumen de los tumores se monitorizó con calibradores y los animales se sacrificaron cuando el volumen tumoral alcanzó ~ 800 mm³. Los gráficos de la mediana del volumen de los tumores continuaron para cada grupo hasta que se sacrificaron uno o más animales. Todos los procedimientos con animales se realizaron respetando un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Usos y Cuidados en una instalación acreditada por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de los animales de laboratorio.

Tinción inmunohistoquímica (IHQ) del LIV-1**Método**

Se adquirieron en el mercado micromatrices tumorales (MMT) y muestras de tumores individuales. Las micromatrices de tejido de tejidos tumorales o normales fijados en formol e incluidos en parafina (FFIP) se compraron a US Biomax Inc. o bien a Cybrdi. Se compró a BioChain una matriz congelada. Los cortes únicos se compraron a NDRI, Asterand, Tissue Solution o CHTN. Un conjunto de 25 muestras incluidas en parafina de cáncer de próstata metastásico insensible a hormonas (que corresponde a los sitios metastásicos de las partes blandas y óseas) lo proporcionó el Dr. R. Vessella, Universidad de Washington, Departamento de Cáncer Genitourinario. Todas las muestras se procesaron en un autoteñidor Bond-MaxTM (Leica).

Tinción por IHQ de los tejidos FFIP:

Los cortes FFIP o las MMT colocadas en portaobjetos de vidrio se desparafinaron con la solución BondTM Dewax (Leica, cat. n.º AR9222) a 72 °C y se rehidrataron. La retirada del antígeno se realizó con la solución 2 de retirada de epítomos BondTM con base de EDTA (Leica, cat. n.º AR9640) durante 20 min a 95-100 °C antes de la incubación con el Acm murino primario frente a LIV-1 (1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30-45 minutos a 25 °C). Se utilizó la IgG1 murina emparejada por isotipo (Sigma; cat. n.º M5284) como control negativo para la tinción de fondo. Para la tinción por IHQ automatizada, utilizamos bien el kit Refine DAB o un kit de detección basado en la fosfatasa alcalina: kit de detección BondTM Polymer AP Red (Leica, cat. n.º DS9305). Se incubaron los cortes con los anticuerpos primarios monoclonales murinos frente a LIV-1 durante 45 min a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con un bloqueo preliminar con proteínas durante 30 min (DAKO cat. n.º X0909). Después del revelado de los cromógenos, los cortes se contratiñeron con hematoxilina y se les colocó el cubreobjetos. Los cortes los evaluó y puntuó un anatomopatólogo, y se tomaron las imágenes con un microscopio Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

IHQ de tejidos congelados:

Los cortes de 5 μm de muestras congeladas/OCT se fijaron con acetona durante 10 min, se secaron al aire durante 30 min y se pretrataron 20 min con Morphosave a 1x a temperatura ambiente. Los portaobjetos se cargaron en un autoteñidor Bond-MaxTM (Leica) y se tiñeron durante 45 min con el anticuerpo primario con un bloqueo preliminar de proteínas durante 30 min (DAKO cat. n.º X0909). Se utilizó la IgG1 de ratón (BD Pharmingen cat. n.º 550878) como control negativo. Para la detección, utilizamos el kit Bond Polymer Refine con base de DAB (Leica, catálogo n.º DS9800). Después del revelado de los cromógenos, los cortes se contratiñeron con hematoxilina y se les colocó el cubreobjetos. Un anatomopatólogo evaluó y puntuó los portaobjetos.

Resultados

1. Fijación del anticuerpo de ratón

La K_D para el anticuerpo BR2-14a que es el anticuerpo monoclonal murino contra LIV-1 (patente de los EE. UU. US 2004141983) se determinó para el LIV-1 de humano expresado como una proteína endógena en una línea celular del cáncer de mama de humano o como una proteína recombinante en una línea de células CHO. La K_D para el anticuerpo murino contra LIV-1, el BR2-14a, se determinó también para el LIV-1 de macaco cangrejero expresado como una proteína recombinante en una línea de células CHO. MCF7 es una línea de células de cáncer de mama de humano. 293F es una línea de células de riñón embrionario de humano. La tabla 1 muestra que el anticuerpo tenía una constante de disociación 5 veces menor aproximadamente por el LIV-1 no recombinante expresado en una línea de células humanas que por el LIV-1 recombinante, tanto si es de humano (hLIV-1) como si es de macaco cangrejero (cyLIV-1).

Tabla 1

Línea celular	Antígeno	Kd (nM)
MCF-7 (ATCC)	hLIV-1	2,4
293F (hLIV-1)	hLIV-1	2,7
CHO (hLIV-1)	hLIV-1	12,5
CHO (cyLIV-1)	cLIV-1	14,0

2. Diseño y comprobación de los anticuerpos humanizados

El punto de partida o el anticuerpo donante para la humanización en este ejemplo es el anticuerpo de ratón BR2-14a producido por el hibridoma que tiene el n.º de acceso de la ATCC PTA-5705A y que se describe en la patente de los EE. UU. US 2004141983. Las secuenciasceptoras idóneas de humano son secuencias genómicas proporcionadas por VH1-02 y JH5 para la cadena pesada y por VK2-30 y Jk4 para la cadena ligera. Las secuenciasceptoras de humano muestran un porcentaje de identidad del 68% y del 85% con las secuencias donantes en las secuencias flanqueantes de la región variable. Las CDR de la cadena ligera de las secuenciasceptoras de humano son del mismo tipo canónico que las CDR de las secuencias donantes. En cambio, las CDR de la cadena pesada de las secuenciasceptoras de humano diferían en su tipo canónico (la célula reproductora era 1-3 frente a 1-2 para el donante murino).

El alineamiento de las secuencias donantes identificó once posiciones en la cadena pesada (H27, H28, H29, H30, H48, H66, H67, H71, H76, H93 y H94) y cinco posiciones en la cadena ligera (L36, L37, L45, L46 y L39) en la que la secuencia aceptora de humano difería de la secuencia donante y que podría afectar a la fijación del anticuerpo como resultado de la puesta en contacto del antígeno directamente, lo que afecta a la conformación de las CDR o afecta al empaquetamiento entre las cadenas ligera y pesada. Se construyeron cinco cadenas pesadas humanizadas y seis cadenas ligeras humanizadas mediante la incorporación de retromutaciones en diferentes permutaciones de estas posiciones (figura 1 (alineamiento de secuencias) y tabla 2).

Tabla 2: Retromutaciones

Variante de V_H	Secuencia aceptora de exón VH	Restos donantes de región flanqueante
hV _H A	VH1-02	ninguno
hV _H B	VH1-02	H29, H30, H76
hV _H C	VH1-02	H66, H67, H71
hV _H D	VH1-02	H27, H93, H94
hV _H E	VH1-02	H27, H28, H29, H30, H48, H76, H66, H67, H71, H93, H94
Variante de V_L	Secuencia aceptora de exón VL	Restos donantes de región flanqueante
hV _K A	VK2-30	ninguno
hV _K B	VK2-30	L36
hV _K C	VK2-30	L37
hV _K D	VK2-30	L45

Variante de V _H	Secuencia aceptora de exón VH	Restos donantes de región flanqueante
hV _K E	VK2-30	L46
hV _K F	VK2-30	L36, L37, L39, L45, L46

5

A continuación, los anticuerpos humanizados se expresaron para representar cada permutación de estas cadenas (30 posibilidades) de las cadenas pesada y ligera humanizadas. Las curvas de fijación para el LIV-1 de humano recombinante expresado por las células CHO se muestran en la figura 2. Las CE₅₀ se resumen en la tabla 3 que viene a continuación.

Tabla 3: CE₅₀ para los anticuerpos monoclonales humanizados frente a LIV-1, procedentes de BR2-14a, sobre el LIV-1 de humano expresado en las células CHO

Ac	CE ₅₀ (µg/ml)
HALA	DNB
HALB	37,8
HALC	25,5
HALD	4,9
HALE	DNB
HALF	8,8
HBLA	19,9
HBLB	0,3
HBLC	44,0
HBLD	17,4
HBLE	DNB
HBLF	0,7
HCLA	DNB
HCLB	1,8
HCLC	DNB
HCLD	66,6
HCLE	DNB
HCLF	1,3
HDLA	DNB
HDLB	2,3
HDLC	DNB
HDLD	67,9
HDLE	DNB
HDLF	1,4
HELA	12,5
HELB	173,3
HELC	DNB
HELD	24,2
HELE	0,3
HELF	1,5
DNB significa «que no se fija».	

Estos datos indican una variación considerable de la CE50 entre los 30 anticuerpos humanizados comprobados con HBLB y HELE que muestran una fijación al menos dos veces mejor que el siguiente anticuerpo humanizado, HBLF, y márgenes más grandes que la mayoría de los anticuerpos humanizados. Las curvas de fijación de la figura 2 muestran que tanto HBLB como HELE se fijaban con más fuerza que el anticuerpo de ratón original.

- 5 El anticuerpo HBLB se seleccionó como el mejor de los anticuerpos humanizados porque tiene (junto con HELE) la fijación más fuerte, pero tiene menos retromutaciones en comparación con HELE, puesto que hay cuatro retromutaciones en HBLB y doce en HELE.

- 10 Las CE50 para el Acm humanizado frente a LIV-1 que se fijaba al LIV-1 de humano expresado en las células CHO se determinaron para el LIV-1 de humano expresado como una proteína nativa en una línea de células MCF7 (figura 3). De nuevo, se determinó que los Acm contra LIV-1 HBLB y HELE eran los que se fijaban con más fuerza.

La Kd del HBLB para el LIV-1 de humano en la línea celular MCF7 se determinó a partir de la media de varias curvas de fijación a saturación que era 1,5 nM, mientras que para el anticuerpo de ratón es 2,9 nM. Es decir, el anticuerpo HBLB tiene aproximadamente el doble de afinidad por el LIV-1 de humano nativo que el anticuerpo de ratón. La curva de fijación a saturación mostrada en la figura 4 es un ejemplo representativo.

- 15 Se compararon dos formas del HBLB por la fijación al LIV-1 de humano expresado de forma recombinante en las células CHO. Una forma se expresó con la IgG1 de humano de tipo silvestre y las regiones constantes κ. La otra forma era igual, excepto por una mutación S239C (numeración de la UE) en la cadena pesada de la IgG1 (denominada LIV-14d o HBLB S239C), que reduce la fijación del anticuerpo a los receptores de Fcγ. En la figura 5 se muestran las curvas de fijación y las CE₅₀ de estos anticuerpos en comparación con el anticuerpo donante de ratón. Las CE50 de ambas formas de HBLB eran similares las unas con las otras (dentro del error del estudio) y ambos eran más fuertes que el anticuerpo de ratón.

Las CE50 de los Acm humanizados frente a LIV-1 HBLB y HBLB S239C también se determinaron para el LIV-1 de macaco cangrejero expresado como una proteína recombinante en una línea celular CHO. Los dos anticuerpos se fijan con la misma afinidad (mejor que los Acm murinos contra LIV-1).

25 **Datos de expresión para LIV-1**

Los Acm murinos contra LIV-1 (al menos 2 para la concordancia) se utilizaron para el análisis inmunohistoquímico de diferentes tipos de tumores mediante el uso de tejidos fijados con formol e incluidos en parafina.

Tabla 4: Resumen de los datos de expresión para el LIV-1 en las muestras tumorales

Origen	Tipo	LIV-1+	N.º de casos	%
Mama	Primario y metastásico (MMT)			28-46
	Tumores primarios	12	12	100
	Tumores metastásicos	17	19	89
	Tras el tratamiento hormonal	19	22	86
	Triple negativo	13	20	65
Próstata	Insensible a las hormonas y metastásico: metástasis ósea	15	25	60
	metástasis en las partes blandas	21	25	84
Ovario	Primario (MMT)	9	72	13
	Metastásico (MMT)	4	11	36
	Tras quimioterapia	5	17	29
Endometrio		7	56	12
Carcinoma de células escamosas (útero y varios órganos)	Tumores primarios	8	114	7
Páncreas	Tumores primarios	9	95	9
Pulmón	Tumores primarios (MMT)	3	192	2

- 30 Observamos menos señal de IHQ para LIV-1 en los estudios efectuados con las micromatrices de tejidos en comparación con grandes cortes de tejido. La diferencia de expresión es muy significativa, lo que sugiere que se

prefiere el análisis de la expresión de LIV-1 en cortes de tejido mayores. Había una buena concordancia de expresión utilizando al menos 2 Acm anti-LIV-1 diferentes. En las figuras 6 y 7 se muestran el alto nivel de expresión de LIV-1 en los tumores de mama y de próstata tras el tratamiento hormonal (tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa), lo que proporciona un fuerte fundamento teórico para actuar selectivamente sobre estos tumores con el CFA contra LIV-1. La figura 8 muestra la expresión de LIV-1 detectable en los tejidos de cáncer de mama triple negativo (ER-, PgR-, Her2-). El nivel de expresión de LIV-1 en el cáncer de mama triple negativo mediante tinción inmunohistoquímica era comparable al nivel en el modelo animal PC3, en donde demostramos la actividad antitumoral de CFA contra LIV-1. Por lo tanto, los cánceres de mama triple negativo son una posible población destinataria, en particular los cánceres de mama triple negativo que se ha hallado que expresan el LIV-1.

10 **Actividad antitumoral *in vitro* del Acm hLIV-14 como CFA y Acm con mejor función efectora (SEA)**

La actividad antitumoral *in vitro* de los CFA contra LIV-1 se midió con ensayos de citotoxicidad (figura 9) y también de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (figuras 10 y 11). Primero, realizamos un estudio de la expresión de LIV-1 en diferentes líneas celulares mediante el análisis cuantitativo por FACS. La línea celular de cáncer de mama MCF-7 de la ATCC tenía el nivel más elevado de sitios de fijación de LIV-1 por célula en comparación con la línea de células MCF-7 de otras fuentes (datos sin mostrar). Utilizamos esta línea celular para ambos ensayos *in vitro*. En cuanto a la figura 9, diferentes CFA hLIV-14 (el anticuerpo HBLB conjugado a vcMMAE (denominado 1006) o a mcMMAF (denominado 1269) (tanto las moléculas pequeñas como los conectores descritos en la patente de los EE. UU. US 20050238649)) eran muy eficaces a la hora de acabar con las células MCF-7, en comparación con los conjugados de control de ausencia de fijación y murinos (mIgG-1006, mIgG-1269, hIgG-1006 y hIgG-1269). Además, los CFA LIV-14d mutantes de cisteína, que tienen una media de dos conectores de fármaco por anticuerpo, también eran muy eficaces a la hora de acabar con las células MCF-7, según se midió mediante el ensayo citotóxico. En cuanto a las figuras 10 y 11, en los ensayos de CCDA, la actividad del Acm fucosilado/de tipo silvestre (WT) y de los CFA se comparó con las versiones mejoradas de la función efectora (Acm sin fucosilar y CFA, a los que se denomina SEA). Los resultados demostraron que los Acm y CFA contra LIV-1 con mejor función efectora tenían una buena actividad de CCDA contra las células MCF-7, en comparación con los Acm o los CFA mejorados sin función efectora (compárese, por ejemplo, en la figura 10, hLIV-1 SEA vcMMAE con hLIV-1 vcMMAE). Con respecto de nuevo a la figura 9, un CFA contra LIV-1 con mejor función efectora (indicado como SEA) también tenía un nivel de actividad citotóxica similar a de los CFA de tipo silvestre (sin fucosilar) (compárese hLIV-1 SEA 1006 (vcMMAE) con hLIV-1 1006 (vcMMAE)). Así pues, la citotoxicidad puede verse afectada tanto por la función efectora como por la acción del conjugado.

10 **Actividad antitumoral *in vivo* del CFA hLIV-14**

Mediante el uso de los modelos de cáncer de mama (MCF-7) y de próstata (PC-3), se determinó la actividad antitumoral de los CFA contra LIV-1 (Acm quiméricos y humanizados (HBLB) con una media de 4 fármacos por anticuerpo) *in vivo* (figuras 12-15). Los CFA contra LIV-1 conjugados con vcMMAE mostraron un retraso tumoral significativo en comparación con los CFA de control y sin tratar. Al menos se observó una regresión completa (RC) en todos los estudios en los que se usó el LIV-1-vcMMAE a 3 mg/kg, en los que numerosos animales tenían tumores que eran estáticos o que crecían lentamente en comparación con los controles. Con respecto a la figura 12, una forma quimérica del anticuerpo murino original conjugado a vcMMAE dio lugar a regresiones completas en 3 de los 7 ratones. Con respecto a la figura 13, el mismo CFA quimérico produjo una regresión completa en 1 de los 8 ratones. Con respecto a la figura 14, un CFA humanizado (HBLB) conjugado a vcMMAE (hLIV-14-vcMMAE(4)) produjo una regresión completa en 1 de los 8 ratones. Además, una forma mutante de cisteína del anticuerpo HBLB, un conector del fármaco vcMMAE conjugado a cada cadena pesada en la posición 239, produjo un conjugado con una carga de fármaco media de 2 conectores de fármaco por anticuerpo; el denominado hLIV-14d-vcMMAE(2) mostraba una actividad similar a la de la forma cargada con 4. Con respecto a la figura 15, el CFA humanizado (HBLB) conjugado a vcMMAE (hLIV-14-vcMMAE(4)) produjo una regresión completa en 1 de los 8 ratones en un modelo de carcinoma de próstata. En cambio, la actividad de los mutantes de cisteína cargados con dos no era tan pronunciada en este modelo (compárese hLIV-14-vcMMAE(4) con hLIV-14d-vcMMAE(2), y hLIV-14-mcMMAF(4) con hLIV-14d-mcMMAF(2)). En resumen, estos estudios demuestran que el CFA contra LIV-1 puede detener o retrasar el crecimiento de los cánceres que expresan el LIV-1, incluidos los cánceres de mama y próstata.

50 **II. Humanización de BR2-22a**

El BR2-22a, a veces también denominado Acm2, es un anticuerpo monoclonal de ratón de isotipo IgG1 k.

Metodologías:

Salvo que se indique otra cosa a continuación, los métodos descritos para la humanización y el análisis de BR2-14a son también aplicables a BR2-22.

55 **Ensayos de fijación a saturación**

En placas de 96 pocillos con fondo en v se distribuyeron alícuotas de 1×10^5 células por pocillo que expresan el antígeno (células MCF7 que expresan el LIV-1 de humano, células 293F, una línea celular CHO transfectada que expresa el LIV-1 de humano, o bien una línea celular CHO transfectada que expresa el LIV-1 de macaco

cangrejero). El BR2-22a murino marcado con AlexaFluor-647 se añadió en concentraciones que iban de 0,66 pM a 690 nM, y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se sedimentaron las células y se lavaron 3 veces con PBS/SAB. A continuación, se sedimentaron las células y se resuspendieron en 125 µl de PBS/SAB. La fluorescencia se analizó por citometría de flujo, y se usó el porcentaje de la señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje fijado y posteriormente calcular la Kd aparente.

Ensayos de fijación competitiva

Se distribuyó en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en hielo con fondo en v una alícuota de 1×10^5 células CHO que expresan el LIV-1 recombinante en PBS. Las células se incubaron durante 1 hora con BR2-22a original marcado con AlexaFluor-647 (AF) a 5 nM y concentraciones crecientes (de 0,038 nM a 600 nM) del anticuerpo BR2-22a humanizado sin marcar en todas las combinaciones de las cadenas ligeras humanizadas LA-LG y de las cadenas pesadas humanizadas HA-HG. Se sedimentaron las células y se lavaron 3 veces con PBS. A continuación, se sedimentaron las células y se resuspendieron en 125 µl de PBS/SAB. La fluorescencia se analizó por citometría de flujo, y se utilizó el porcentaje de la señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje del anticuerpo BR2-22a humanizado marcado que se fijó y posteriormente extrapolar la CE_{50} al ajustar los datos a una curva sigmoidea de respuesta a la dosis con una pendiente variable.

Estudio de la actividad *in vivo*

A los ratones atímicos (*nu/nu*) (7-8 animales/grupo) se les implantaron células tumorales que se hicieron crecer en cultivo: MCF-7 (NCI) a 5×10^6 en matrigel al 25%, PC3 de la ATCC ($2,5 \times 10^6$ células en matrigel al 25%) y PC3 del DSMZ (5×10^5 en matrigel al 25%). Para el crecimiento *in vivo* de células MCF-7, los ratones hembra recibieron el suplemento de estrógenos mediante la implantación de una microesfera de estrógenos de liberación lenta (liberación de 90 días). La dosificación con CFA contra LIV-1 humanizado o quimérico, o bien el CFA de control sin fijación (3 mg/kg) comenzó cuando los tumores alcanzaron los 100 mm³ (cada 4 días \times 4 inyecciones intraperitoneales). El volumen de los tumores se monitorizó con calibradores y los animales se sacrificaron cuando el volumen tumoral alcanzó ~ 800 mm³. Los gráficos de la mediana del volumen de los tumores continuaron para cada grupo hasta que se sacrificaron uno o más animales. Todos los procedimientos con animales se realizaron respetando un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Usos y Cuidados en una instalación acreditada por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de los animales de laboratorio.

Resumen de los resultados y discusión

Fijación a saturación

El BR2-22a muestra una identidad del 94% con BR2-14a en la región variable de la cadena pesada madura y una identidad del 91% en la región variable de la cadena ligera madura. La KD para el BR2-22a murino contra LIV-1 (tabla 5) se determinó para el LIV-1 de humano expresado como una proteína endógena en una línea celular de cáncer de mama de humano, en las células 293F, o como una proteína recombinante en una línea de células CHO. La KD para el BR2-22a también se determinó para el LIV de macaco cangrejero expresado como una proteína recombinante en una línea de células CHO.

Tabla 5: Mediciones de afinidad de BR2-22a por el LIV-1 de humano (hLIV-1) y de macaco cangrejero (cyLIV-1).

Línea celular	Antígeno	Kd (nM)
MCF7 (ATCC)	hLIV-1	1,1
293F (hLIV-1)	hLIV-1	0,5
Cho hLIV-1	hLIV-1	1,5
Cho cyLIV-1	cLIV-1	4.2

Estrategia de humanización

El anticuerpo BR2-22a se humanizó utilizando una secuencia aceptora de células reproductoras VH1-02 JH5 para la cadena pesada y una secuencia aceptora VK2-30 JK4 para la cadena ligera. Estas secuenciasceptoras se eligieron basándose en que tienen la identidad de secuencia más alta con las secuencias flanqueantes de la región variable madura de las cadenas pesada y ligera de BR2-22A. Inicialmente, se construyeron cinco cadenas pesadas variantes. Cada una incluía las tres CDR de Kabat de la cadena pesada de BR2-22a, y las cadenas difieren por tener de cero (VA) a 11 (VE) retromutaciones. Inicialmente, se construyeron seis cadenas ligeras variantes. Cada una incluía las tres CDR de Kabat de la cadena ligera de BR2-22a y de cero (LA) a cuatro (LF) retromutaciones. Estas retromutaciones se eligieron como resultado de modelar el anticuerpo BR2-22A para identificar las posiciones con potencial para interactuar con el antígeno directamente, afectar la conformación de CDR o afectar la interfaz entre las cadenas pesada y ligera, y basándose en la experiencia previa a la hora de humanizar el BR2-14a debido a la elevada identidad de secuencia entre BR2-14a y BR2-22a. De hecho, las mismas once posiciones en la cadena

pesada y las mismas cuatro posiciones en la cadena ligera se consideraban para la retromutación en BR2-14a y BR2-22a (L39 no se consideró en BR2-22a porque el resto de ratón es el mismo que el resto de humano). Las retromutaciones presentes en cada variante de BR2-22a humanizado se muestran en las tablas 6 y 7 que vienen a continuación.

5 Tabla 6

Variante de V _H	Secuencia aceptora de exón VH	Restos donantes de región flaqueante
hV _H A	VH1-02	Ninguno
hV _H B	VH1-02	H29, H30, H76
hV _H C	VH1-02	H66, H67, H71
hV _H D	VH1-02	H27, H93, H94
hV _H E	VH1-02	H27, H28, H29, H30, H48, H66, H67, H71, H76, H93, H94
hV _H F	VH1-02	H27, H29, H30, H94
hV _H G	VH1-02	H27, H29, H30, H76, H94

Tabla 7

Variante de V _L	Secuencia aceptora de exón VL	Restos donantes de región flaqueante
hV _K A	VK2-30	Ninguno
hV _K B	VK2-30	L36
hV _K C	VK2-30	L37
hV _K D	VK2-30	L45
hV _K E	VK2-30	L46
hV _K F	VK2-30	L36, L37, L45, L46
hV _K G	VK2-30	L36, L46

La secuencia completa de la región variable madura de cada variante se muestra en las figuras 16A y 16B.

- 10 A continuación, todas las permutaciones de estas cinco cadenas pesadas y seis cadenas ligeras se analizaron en un ensayo competitivo en comparación con el BR2-22a (véase la figura 17). Sorprendentemente, en vistas de la experiencia con el anticuerpo BR2-14a en el que la fijación mejorada con respecto al anticuerpo de ratón se obtuvo con solo cuatro retromutaciones y otras retromutaciones no mejoraban necesariamente la afinidad de fijación, la única combinación de las cadenas humanizadas que mostraba afinidad de fijación que se aproximaban a la de BR2-22a era HELF con 15 retromutaciones. Las otras permutaciones mostraban una mala fijación o ninguna fijación significativa a LIV-1. Las CE₅₀ de las diferentes permutaciones se muestran en la tabla 8 que viene a continuación.
- 15

Tabla 8: CE₅₀ para los anticuerpos BR2-22a humanizados

Ac	CE ₅₀ (µg/ml)
HALA	DNB
HALB	DNB
HALC	DNB
HALD	DNB
HALE	DNB
HALF	33,2
HBLA	DNB
HBLB	4,9
HBLC	DNB

Ac	CE ₅₀ (µg/ml)
HBLD	DNB
HBLE	DNB
HBLF	6,5
HCLA	DNB
HCLB	>100
HCLC	DNB
HCLD	DNB
HCLE	DNB
HCLF	>100
HDLA	DNB
HDLB	DNB
HDLC	DNB
HDLD	DNB
HDLE	DNB
HDLF	14,4
HELA	68,2
HELB	>100
HELC	65,7
HELD	>100
HELE	25,1
HELF	0,3
HELG	0,2
HFLF	0,8
HFLG	0,8
HGLF	0,4
HGLG	0,5
DNB significa «que no se fijó».	

5 Aunque HELF muestra una fijación satisfactoria, el anticuerpo contiene un total de 15 retromutaciones, un número mayor del ideal con respecto a la posible inmunogenia. Por lo tanto, las cadenas HE y LF se hicieron variar sistémicamente para comprobar el efecto de retirar cada una de las retromutaciones. En la figura 18 se muestran las variantes comprobadas. De LF-1 a LF-4 difieren de LF en que cada una carece de una retromutación diferente presente en LF. De igual forma, de HE-1 a HE-11 carecían de una de las retromutaciones presentes en HE. En la figura 19 se compara de LF-1 a LF-4 (cada una emparejada con HE). En la figura 19 se muestra que LF-2 y LF-3 pierden una parte importante de la afinidad de fijación con respecto a LF (indicado como el control histórico de HELF en el gráfico), mientras que LF-1 y LF-4 no. Se concluye que las retromutaciones L36 y L46 contribuyen sustancialmente a la retención de la afinidad de fijación, mientras que las retromutaciones en las posiciones L37 y L45 son dispensables, sin un efecto significativo sobre la fijación. En la figura 20 se muestran curvas de fijación similares para las variantes de HE. En la figura 20 se muestra que HE-11 perdió la mayoría de su fijación, lo que indica que la retromutación en la posición H94 tiene el mayor efecto sobre la afinidad de fijación de las retromutaciones comprobadas. La pérdida de las retromutaciones en las posiciones H27, H29 y H30 también ocasionó una pérdida significativa de afinidad. La función de H30 se puede racionalizar por el resto de ratón que es el resultado de la mutación somática. La pérdida de una retromutación en la posición H76 ocasionó alguna pérdida de afinidad. Las otras retromutaciones en las posiciones H28, H48, H66, H67, H71 y H93 serían dispensables, con poco o ningún efecto sobre la afinidad de fijación.

20 A la luz de estos experimentos, las cadenas pesadas HF y HG se construyeron como la cadena ligera LG. HF incluía retromutaciones en H27, H29, H30 y H94, y HG incluía estas mutaciones y una retromutación en H76. LG contiene

retromutaciones en L36 y L46. Se analizaron varias permutaciones de HF, HG, LE y LF por su fijación competitiva, como se muestra en la figura 21, y todas mostraban fijación en el margen de un factor de tres de la de BR2-22a de ratón.

5 A la luz de este experimento, se seleccionó HGLG para otros experimentos más como representante de la mejor combinación de afinidad de fijación con menos retromutaciones. Este anticuerpo se denomina de aquí en lo sucesivo hLIV22. La afinidad de fijación a saturación de hLIV22 por el LIV-1 de humano y de macaco cangrejero expresado en las células CHO se muestra en la figura 22 en comparación con la de hLIV14. En la figura 22 se muestra que el hLIV22 tiene una afinidad (inverso de la constante de disociación) por el LIV-1 de humano aproximadamente cuatro veces mayor que el hLIV-14. Además, la afinidad de hLIV22 por el LIV-1 de humano es igual, dentro del error experimental, que su afinidad por el LIV-1 de macaco cangrejero, mientras que hLIV14 muestra el doble de afinidad por el LIV-1 de humano que por el LIV-1 de macaco cangrejero. La afinidad de hLIV22 por el LIV-1 de humano es igual, dentro del error experimental, que la del anticuerpo de ratón original, BR2-22a.

Actividad antitumoral *in vitro* de los CFA hLIV22

15 La actividad antitumoral *in vitro* del CFA hLIV22 se midió mediante ensayos de citotoxicidad. Primero, realizamos una prospección de la expresión de LIV-1 en diferentes líneas celulares mediante el análisis cuantitativo por FACS. La línea celular de cáncer de mama MCF-7 de la ATCC tenía el nivel más elevado de sitios de fijación de LIV-1 por célula en comparación con la línea de células MCF-7 de otras fuentes (datos sin mostrar). Utilizamos esta línea celular para ensayos *in vitro*. Observamos que diferentes CFA hLIV22 (conjugado a vcMMAE (denominado 1006) o mcMMAF (denominado 1269) (ambas moléculas pequeñas se describen en la patente de los EE. UU. US 2005-0238649)) eran muy eficaces a la hora de acabar con las células MCF-7 según se mide mediante el ensayo citotóxico *in vitro*. En las figuras 23 y 24 se compara el hLIV22 conjugado a 1006 o 1269 con un anticuerpo de control que no se fija conjugado a 1006 o 1269.

Actividad antitumoral *in vivo* del CFA contra LIV-1

25 Mediante el uso de los modelos de cáncer de próstata (PC-3) y de cáncer de mama (MCF-7) como se muestra en las figuras 25 y 26, determinamos la actividad antitumoral *in vivo* de los CFA hLIV22 (con una media de 4 fármacos por anticuerpo). Los CFA hLIV22 conjugados a vcMMAE mostraban un retraso tumoral significativo en comparación con los CFA de control y sin tratar. Había numerosas regresiones completas que se observaron en el estudio de MCF-7 con los hLIV22-vcMMAE a 3 mg/kg. Adicionalmente, en todos los estudios había numerosos animales que tenían tumores que eran estáticos o crecían lentamente en comparación con los controles. Estos estudios demuestran que el CFA hLIV22 puede detener o retrasar el crecimiento de los cánceres que expresan el LIV-1, incluidos los cánceres de mama y próstata. En la figura 27 se compara la actividad de los CFA hLIV22 y hLIV14 en el modelo de MCF-7. Aunque ambos anticuerpos eran eficaces, el hLIV22 era ligeramente más eficaz. Los CFA hLIV22 también se analizaron en un modelo de cáncer de cuello uterino. Se utilizó un modelo de xenoinjerto de células HeLa para el ensayo. Después de que los tumores crecieran a un tamaño adecuado, se administró a los animales el hLIV22 conjugado a vcMMAE a 3 mg/kg y a 1 mg/kg. Se administró un conjugado de anticuerpo de control a 3 mg/kg. Se observó una regresión completa y parcial en los animales que recibieron 3 mg/kg del conjugado de hLIV22 a vcMMAE (no se muestran los datos). Así pues, los anticuerpos contra LIV-1 y los conjugados de fármaco con anticuerpo se pueden utilizar para tratar los cánceres de cuello uterino que expresan LIV-1.

III. Tratamiento del cáncer de piel con los anticuerpos anti-LIV-1

40 Expresión de la proteína LIV-1 en las muestras tumorales de melanoma

Las muestras de melanoma de los pacientes se valoraron por la expresión del LIV-1, mediante la tinción IHQ. Los portaobjetos de FFIP se desparafinaron con la solución Bond™ Dewax (Leica, cat n.º AR9222) a 72 °C. La retirada del antígeno se realizó con la solución 2 de retirada de epítipo Bond™ a base de EDTA (Leica, cat n.º AR9640) durante 20 minutos a 100 °C. Para la tinción IHQ, utilizamos el kit de detección basado en la fosfatasa alcalina: Kit de detección Bond™ Polymer Refine Red (Leica, cat n.º DS9390). Se incubaron los portaobjetos con los anticuerpos primarios monoclonales murinos frente a LIV-1 (BR2-14a) durante 45 min a 1 µg/ml con un bloqueo preliminar de las proteínas durante 30 min (DAKO cat n.º X0909). Se utilizó la IgG de ratón (Sigma, cat n.º M5284) como control negativo. Después del revelado de los cromógenos, los cortes se contratiñeron con hematoxilina y se les colocó el cubreobjetos. Un anatomopatólogo evaluó y puntuó los portaobjetos.

50 Los resultados se muestran en la figura 28. El 72% de las muestras de pacientes con melanoma analizadas (21/29) daban positivo para la expresión del LIV-1. Esto indica que los inhibidores de LIV-1, p. ej., los anticuerpos anti-LIV-1, se pueden utilizar para tratar los cánceres de melanoma.

Actividad antimelanoma *in vivo* del CFA contra LIV-1

55 A los ratones atímicos (nu/nu) (7 a 8 animales/grupo) se les implantan 10×10^6 células SK-MEL-5 (una línea de células procedentes del tumor de melanoma) hechas crecer en cultivo. Los tumores se dejan crecer *in vivo* hasta que tienen 100 mm^3 , según se mide con un calibrador. Los CFA humanizados contra LIV-1, p. ej., hLIV14 o hLIV22, se administran a 3 mg/kg. Los conjugados de fármaco son, p. ej., vcMMAE o mcMMAF. Los CFA de control también

se administran a animales de control a 3 mg/kg. Los CFA se administran cada cuatro días en 4 inyecciones intraperitoneales. El volumen de los tumores se monitoriza con calibradores y los animales se sacrifican cuando el volumen tumoral alcanza ~800 mm³. La administración de CFA hLIV14 o CFA hLIV22 reduce enormemente el crecimiento tumoral en los animales en comparación con los animales que reciben los CFA de control.

5 **Listado de secuencias**

SEQ ID n.º 1 <Líder de la cadena ligera del Acm contra LIV-1; PRT/1; *Mus musculus*>

MKLPVRLLVLMFWIPVSTS

SEQ ID n.º 2 <Líder de la cadena pesada del Acm contra LIV-1; PRT/1; *Mus musculus*>

MKCSWVIFFLMAVVLGINS

10 SEQ ID n.º 3 <Líder de la cadena pesada de reemplazo; PRT/1; *Mus musculus*>

MAWVWTLFLMAAAQSAQA

SEQ ID n.º 4 <Región constante de la cadena ligera; PRT/1; *Homo sapiens*>

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

SEQ ID n.º 5 <CH1-CH3; PRT/1; *Homo sapiens*>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
15 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID n.º 6 <CH1 - CH3 de cadena pesada (sin K carboxiterminal); PRT/1; *Homo sapiens*>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID n.º 7 <CH1 - CH3 de cadena pesada S239C; PRT/1; *Homo sapiens*>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20 SEQ ID n.º 8 <CH1 - CH3 de cadena pesada S239C (sin K carboxiterminal); PRT/1; *Homo sapiens*>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSINKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID n.º 9 <HA del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTEYAPTFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHDAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 10 <HB del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTIEDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTEYAPTFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHDAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 11 <HC del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTEYAPTFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHDAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 12 <HD del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTEYAPTFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCNVHDAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 13 <HE del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIEDYIMHWVRQAPGQGLEWIGWI
DPENGDTEYAPTFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCNVHDAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 14 <LA del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWFQQRPGQSPRR
LIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 15 <LB del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

15 DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWYQQRPGQSPRR
LIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 16 <LC del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWFLQQRPGQSPRR
LIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 17 <LD del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWFQQRPGQSPKR
LIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 18 <LE del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWFQQRPGQSPRL
LIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 19 <LF del Acm contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWYLQKPGQSPKL
LIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

5 Secuencias de ADN:

SEQ ID n.º 20 <Líder de la cadena pesada del Acm contra LIV-1; ADN; *Mus musculus*>

atgaaatgcagctgggtcatcttcttctcctgatggcagtggttctaggaatc
aattca

SEQ ID n.º 21 <Líder de la cadena ligera del Acm contra LIV-1; ADN; *Mus musculus*>

atgaagttgcctgtaggctggtggctgatggttctggattcctgttct
accagt

10 SEQ ID n.º 22 <Secuencia líder de cadena pesada de remplazo; ADN; *Mus musculus*>

atggcttgggtgtggacctgctattcctgatggcagctgcccaggatgcc
caagca

SEQ ID n.º 23 <Región constante de la cadena ligera; ADN; *Mus musculus*>

acgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttg
aaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccaga
gaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagc
agcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcc
tgcgaagtcaccatcaggccctgagctcgcccgtcacaagagcttcaac
aggggagagtgt

SEQ ID n.º 24 <CH1-CH3; ADN; *Homo sapiens*>

gctagcaccaggggcccacatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagc
acctctgggggcacagctgccctgggctgcctggtcaaggactacttcct
gaacctgtgacagtgctcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcac
accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtg
gtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtg
aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatct
tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggg
ggaccgtcagttcttcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatc
tcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgaggaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
aaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaaa

15

ES 2 620 264 T3

gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgg
gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
tacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagc
ctctccctgtctccgggtaaa

SEQ ID n.º 25 <CH1-CH3 (sin K carboxiterminal); ADN; *Homo sapiens*>

gtagcaccaagggccccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagc
acctctgggggacagctgccctgggctgcctggtcaaggactacttcct
gaacctgtgacagtgtcctggaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcac
accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg
gtgacctgccccccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg
aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatct
tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggg
ggacctgagctcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatc
tcccggacccctgaggtcacatgctggtgggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
aaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa
gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgg
gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
tacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagc
ctctccctgtctccgggt

SEQ ID n.º 26 <CH1-CH3 de S239C; ADN; artificial>

gtagcaccaagggccccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagc
acctctgggggacagctgccctgggctgcctggtcaaggactacttcct
gaacctgtgacagtgtcctggaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcac
accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg
gtgacctgccccccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg
aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatct
tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggg
ggacctggtgtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatc
tcccggacccctgaggtcacatgctggtgggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
aaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa
gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgg
gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
tacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagc
ctctccctgtctccgggtaaa

ES 2 620 264 T3

SEQ ID n.º 27 <CH1-CH3 de S239C (sin K carboxiterminal); ADN; artificial>

gctagcaccaagggcccacatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagc
acctctgggggacacagctgccctgggctgcctggcgaaggactacttcct
gaacctgtgacagtgctcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcac
accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg
gtgaccgtgccctccagcagcttgggacccagacctacatctgcaacgtg
aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaactt
tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccacagcactgaactcctggg
ggaccgtgtgtcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatc
tcccggaaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcagctaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
aaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa
gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgg
gatgagctgaccaagaaccaggctcagcctgacctgcctggtcaaaggctt
tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctt
tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccctacacacagaagagc
ctctccctgtctccgggt

SEQ ID n.º 28 <HA del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatg
cactgggtgaggcaggccccctggacaagggcttgagtggatgggatggatt
gatcctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttccagggcagggc
accatgaccaggacacctccatcagcagcctacatggagctgagcagg
ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacatgatgctcac
tatgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctggtcacagtctcc
tca

SEQ ID n.º 29 <HB del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatg
cactgggtgaggcaggccccctggacaagggcttgagtggatgggatggatt
gatcctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttccagggcagggc
accatgaccaggacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcagg
ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacatgatgctcac
tatgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctggtcacagtctcc
tca

SEQ ID n.º 30 <HC del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatg
cactgggtgaggcaggccccctggacaagggcttgagtggatgggatggatt
gatcctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttccagggcaaggcc
actatgactgcagacacctccatcagcagcctacatggagctgagcagg
ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacatgatgctcac
tatgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctggtcacagtctcc
tca

ES 2 620 264 T3

SEQ ID n.º 31 <HD del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaggtctcctgcaaggcttctggattcaccttcacagactactatatg
cactgggtgagggcaggcccctggacaagggttgagtggatgggatggatt
gatcctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttcaggggcagggtc
acatgaccaggacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcagg
ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtgcccagacatgatgctcac
tatgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcc
tca

SEQ ID n.º 32 <HE del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

Caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaggtctcctgcaaggcttctggattcaacattgaagactactatatg
cactgggtgagggcaggcccctggacaagggttgagtggattggatggatt
gatcctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttcaggggcaaggcc
actatgactgcagacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcagg
ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtaatgtccatgatgctcac
tatgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcc
tca

SEQ ID n.º 33 <LA del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttgtgatgactcagctctccactctccctgcctgtcacccttggacag
cctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatgga
aacacctatthggatggtttcagcagaggccaggccaatctccaaggagg
ctaatttatagagtttccaacaggttttctgggggtcccagacagattctct
ggcagtgggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcagggtggaggct
gaggatggtggggtttattactgctttcaaggttcacatggtccctacacc
tttggaggagggaccaaggtggagatcaaactg

SEQ ID n.º 34 <LB del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttgtgatgactcagctctccactctccctgcctgtcacccttggacag
cctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatgga
aacacctatthggatggtaccagcagaggccaggccaatctccaaggagg
ctaatttatagagtttccaacaggttttctgggggtcccagacagattctct
ggcagtgggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcagggtggaggct
gaggatggtggggtttattactgctttcaaggttcacatggtccctacacc
tttggaggagggaccaaggtggagatcaaactg

SEQ ID n.º 35 <LC del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttgtgatgactcagctctccactctccctgcctgtcacccttggacag
cctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatgga
aacacctatthggatggtttctgcagaggccaggccaatctccaaggagg
ctaatttatagagtttccaacaggttttctgggggtcccagacagattctct
ggcagtgggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcagggtggaggct
gaggatggtggggtttattactgctttcaaggttcacatggtccctacacc
tttggaggagggaccaaggtggagatcaaactg

SEQ ID n.º 36 <LD del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttgatgactcagtcctccactctccctgcctgtcacccttggacag
 cctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatgga
 aacacctatttggaatggtttcagcagaggccaggccaatctccaaagagg
 ctaatttatagagtttccaacaggttttctgggggtcccagacagattctct
 ggcagtgggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcaggggtggaggct
 gaggatggtgggggtttattactgctttcaagggtcacatggtccctacacc
 tttggaggagggaccaaggtggagatcaaact

SEQ ID n.º 37 <LE del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttgatgactcagtcctccactctccctgcctgtcacccttggacag
 cctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatgga
 aacacctatttggaatggtttcagcagaggccaggccaatctccaaaggctc
 ctaatttatagagtttccaacaggttttctgggggtcccagacagattctct
 ggcagtgggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcaggggtggaggct
 gaggatggtgggggtttattactgctttcaagggtcacatggtccctacacc
 tttggaggagggaccaaggtggagatcaaact

SEQ ID n.º 38 <LF del Acm contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttgatgactcagtcctccactctccctgcctgtcacccttggacag
 cctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatgga
 aacacctatttggaatggtacctgcagaaaccaggccaatctccaaagctc
 ctaatttatagagtttccaacaggttttctgggggtcccagacagattctct
 ggcagtgggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcaggggtggaggct
 gaggatggtgggggtttattactgctttcaagggtcacatggtccctacacc
 tttggaggagggaccaaggtggagatcaaact

5

SEQ ID n.º 39 <Líder de la cadena ligera del Acm2 contra LIV-1; PRT/1; *Mus musculus*>

MKLPVRLLVLMFWIPVATSS

SEQ ID n.º 40 <Líder de la cadena pesada del Acm2 contra LIV-1; PRT/1; *Mus musculus*>

MKCSWVIFFLMAVVIGINS

10 SEQ ID n.º 41 <Secuencia líder de cadena pesada de remplazo; PRT/1; *Mus musculus*>

MAVWVTLFLMAAAQSAQA

SEQ ID n.º 42 <Región constante de la cadena ligera; PRT/1; *Homo sapiens*>

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGE

SEQ ID n.º 43 <CH1-CH3; PRT/1; *Homo sapiens*>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVH
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
 CDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

15

SEQ ID n.º 44 <CH1 - CH3 de cadena pesada (sin K carboxiterminal); PRT/1; *Homo sapiens*>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID n.º 45 <CH1 - CH3 de cadena pesada S239C; PRT/1; *Homo sapiens*>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID n.º 46 <CH1 - CH3 de cadena pesada S239C (sin K carboxiterminal); PRT/1; *Homo sapiens*>

5 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID n.º 47 <HA del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDEYGPKEFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARHNAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 48 <HB del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTIEDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDEYGPKEFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLSDDTAVYYCARHNAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 49 <HC del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDEYGPKEFQ GKATMTADTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARHNAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 50 <HD del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDEYGPKEFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCTVHNAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

15 SEQ ID n.º 51 <HE del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLNIEDYYMHWVRQAPGQGLEWIGWI
DPENGDEYGPKEFQ GKATMTADTSINTAYMELSRRLSDDTAVYYCTVHNAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 52 <HF del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLTIEDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTEYGPKEFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAVHNAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

SEQ ID n.º 53 <HG del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLTIEDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTEYGPKEFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLSDDTAVYYCAVHNAH
YGTWFAYWGQGLTLTVSS

5 SEQ ID n.º 54 <LA del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWFQQRPGQSPRR
LIYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 55 <LB del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWYQQRPGQSPRR
LIYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 56 <LC del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWFLQRPQSPRR
LIYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
10 FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 57 <LD del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWFQQRPGQSPKR
LIYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 58 <LE del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWFQQRPGQSPRP
LIYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

15 SEQ ID n.º 59 <LF del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWYLQRPQSPKP
LIYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

SEQ ID n.º 60 <LG del Acm2 contra hLIV-1; PRT/1; artificial>

DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWYQQRPGQSPRP
LIYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYT
FGGGTKVEIKR

Secuencias de ADN:

20 SEQ ID n.º 61 <Líder de la cadena pesada del Acm2 contra LIV1; ADN; *Mus musculus*>

atgaaatgcagctgggtcatcttcttctctgatggcagtggttataggaatc
aattca

SEQ ID n.º 62 <Líder de la cadena ligera del Acm2 contra LIV1; ADN; *Mus musculus*>

ES 2 620 264 T3

atgaagttgcctgtaggctggtggctgatgttctggattcctgctacc
agcagt

SEQ ID n.º 63 <Líder de cadena pesada de remplazo; ADN; *Mus musculus*>

atggcttgggtgtggaccttgctattcctgatggcagctgcccaagtgcc
caagca

SEQ ID n.º 64 <Región constante de la cadena ligera; ADN; *Homo sapiens*>

acgacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcag
ttgaaatctggaactgcctctggtgtgtgctgctgaataacttctatccc
agagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaac
tcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctc
agcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctac
gcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcaciaaagagcttc
aacaggggagagtgttag

SEQ ID n.º 65 <CH1-CH3; ADN; *Homo sapiens*>

gctagcacciaagggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagc
acctctgggggcacagctgccttgggctgctggtaaggactacttcct
gaacctgtgacagtgctcctggaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcac
accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg
gtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg
aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccaaatct
tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggg
ggaccgtcagttctcctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatc
tcccggaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
aaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa
gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgg
gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtaaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagc
ctctcctgtctccgggtaaa

SEQ ID n.º 66 <CH1-CH3 (sin K carboxiterminal); ADN; *Homo sapiens*>

ES 2 620 264 T3

gctagcaccaagggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagc
acctctgggggacacagctgccctgggctgcctggcaaggactacttcct
gaacctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccageggcgtgcac
accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg
gtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg
aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatct
tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggg
ggaccgtcagtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatc
tcccggaccctgaggtcacatgctggtggaggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
aaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa
gcaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgg
gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggggcagccggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagc
ctctccctgtctccgggt

SEQ ID n.º 67 <CH1-CH3 S239C; ADN; artificial>

gctagcaccaagggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagc
acctctgggggacacagctgccctgggctgcctggcaaggactacttcct
gaacctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccageggcgtgcac
accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg
gtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg
aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatct
tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggg
ggaccgtgtgtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatc
tcccggaccctgaggtcacatgctggtggaggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
aagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
aaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaa
gcaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgg
gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttc
tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggggcagccggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagc
ctctccctgtctccgggtaa

SEQ ID n.º 68 <CH1-CH3 S239C (sin K carboxiterminal); ADN; artificial>

gctagcaccaagggcccacatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagc
 acctctgggggcacagctgccctgggctgcctggcgaaggactacttcct
 gaacctgtgacagtgctcctggaactcagggcgcctgaccagcggcgtgcac
 accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtg
 gtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtg
 aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatct
 tgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggg
 ggaccgtgtgtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatc
 tcccgaccctgaggtcacatgctgtgggtggacgtgagccacgaagac
 cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
 aagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagc
 gtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
 aaggtctccaacaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaaa
 gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgg
 gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggctaaaggcttc
 tatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggagccgggagaac
 aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
 tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
 tcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccctacacacagaagagc
 ctctccctgtctccgggt

SEQ ID n.º 69 <HA del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
 gtgaaggctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatg
 cactgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggtggatggatg
 gatcctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaagttccagggcagggtc
 accatgaccagggacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcagg
 ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacataatgctcac
 tacgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctggtcacagctctcc
 tca

SEQ ID n.º 70 <HB del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
 gtgaaggctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatg
 cactgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggtggatggatg
 gatcctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaagttccagggcagggtc
 accatgaccagggacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcagg
 ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacataatgctcac
 tacgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctggtcacagctctcc
 tca

SEQ ID n.º 71 <HC del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
 gtgaaggctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatg
 cactgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggtggatggatg
 gatcctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaagttccagggcaaggcc
 accatgaccgcagacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcagg
 ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacataatgctcac
 tacgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctggtcacagctctcc
 tca

SEQ ID n.º 72 <HD del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

ES 2 620 264 T3

Caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaggtctcctgcaaggcttctggactcaccttcacagactactatatg
cactgggtgaggcaggcccctggacaagggcttgagtggatgggatggatt
gatcctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaagtccaggggcagggtc
accatgaccagggacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcagg
ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtactgtccataatgctcac
tacgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcc
tca

SEQ ID n.º 73 <HE del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaggtctcctgcaaggcttctggactcaacattgaagactactatatg
cactgggtgaggcaggcccctggacaagggcttgagtggatgggatggatt
gatcctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaagtccaggggcaaggcc
accatgaccgcagacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcagg
ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtactgtccataatgctcac
tacgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcc
tca

SEQ ID n.º 74 <HF del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaggtctcctgcaaggcttctggactcaccattgaagactactatatg
cactgggtgaggcaggcccctggacaagggcttgagtggatgggatggatt
gatcctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaagtccaggggcagggtc
accatgaccagggacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcagg
ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtgcccgtccataatgctcac
tacgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcc
tca

SEQ ID n.º 75 <HG del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca
gtgaaggtctcctgcaaggcttctggactcaccattgaagactactatatg
cactgggtgaggcaggcccctggacaagggcttgagtggatgggatggatt
gatcctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaagtccaggggcagggtc
accatgaccagggacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcagg
ctgagatctgatgacacagctgtgtattactgtgcccgtccataatgctcac
tacgggacctggtttgcctactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcc
tca

SEQ ID n.º 76 <LA del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatggttgatgactcagtctcc
actctccctgcctgtcacccttgacagcctgcctccatctcctgcagatc
tagtcagagccttttacacagtagtggaacacctatttagaatggtttca
gcagaggccaggccaatctccaaggaggctaatttataaaatttccaccgg
atthctgggggtcccagacagattctctggcagtggttcaggcactgattt
cacactgaaaatcagcagggtggaggctgaggatggtggggtttattactg
ctttcaaggttcacatgttccctacacctttggaggagggaaccaagggtgga
gatcaaacgtacg

SEQ ID n.º 77 <LB del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatggtgtgatgactcagtctcc
actctccctgcctgtcacccttggacagcctgcctccatctcctgcagatc
tagtcagagccttttacacagtagtggaacacctattagaatggtacca
gcagagggccaggccaatctccaaggaggctaatttataaaatttccaccg
atcttctgggggtcccagacagattctctggcagtggttcaggcactgatt
cacactgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatggtggggtttattactg
ctttcaagggttcacatgttccctacaccttggaggagggaaccaaggtgga
gatcaaacgtacg

SEQ ID n.º 78 <LC del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatggtgtgatgactcagtctcc
actctccctgcctgtcacccttggacagcctgcctccatctcctgcagatc
tagtcagagccttttacacagtagtggaacacctattagaatggtttct
gcagagggccaggccaatctccaaggaggctaatttataaaatttccaccg
atcttctgggggtcccagacagattctctggcagtggttcaggcactgatt
cacactgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatggtggggtttattactg
ctttcaagggttcacatgttccctacaccttggaggagggaaccaaggtgga
gatcaaacgtacg

SEQ ID n.º 79 <LD del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatggtgtgatgactcagtctcc
actctccctgcctgtcacccttggacagcctgcctccatctcctgcagatc
tagtcagagccttttacacagtagtggaacacctattagaatggtttca
gcagagggccaggccaatctccaaggaggctaatttataaaatttccaccg
atcttctgggggtcccagacagattctctggcagtggttcaggcactgatt
cacactgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatggtggggtttattactg
ctttcaagggttcacatgttccctacaccttggaggagggaaccaaggtgga
gatcaaacgtacg

SEQ ID n.º 80 <LE del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatggtgtgatgactcagtctcc
actctccctgcctgtcacccttggacagcctgcctccatctcctgcagatc
tagtcagagccttttacacagtagtggaacacctattagaatggtttca
gcagagggccaggccaatctccaaggcccctaatttataaaatttccaccg
atcttctgggggtcccagacagattctctggcagtggttcaggcactgatt
cacactgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatggtggggtttattactg
ctttcaagggttcacatgttccctacaccttggaggagggaaccaaggtgga
gatcaaacgtacg

SEQ ID n.º 81 <LF del Acm2 contra hLIV-1; ADN; artificial>

gatgttgtgatgactcagtctccactctccctgcctgtcacccttggacag
cctgcctccatctcctgcagatctagtcagagccttttacacagtagtgg
aacacctattagaatggtacctgcagagggccaggccaatctccaagccc
ctaatttataaaatttccaccgatttctgggggtcccagacagattctct
ggcagtggttcaggcactgatttcacactgaaaatcagcaggggtggagg
ctgaggatggtggggtttattactgctttcaagggttcacatgttccctac
accttggaggagggaaccaaggtggagatcaaacgt

SEQ ID n.º 82 <LG del BR2-22a contra hLIV1; ADN; artificial>

ES 2 620 264 T3

gatgtttgatgactcagtctccactctccctgcctgtcacccttggacag
cctgcctccatctcctgcagatctagtcagagccttttacacagtagtgga
aacacctattagaatggtaccagcagaggccaatctccaaggccc
ctaatttataaaaatttccaccggattttctgggggtcccagacagattctct
ggcagtggggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcaggggtggaggct
gaggatggtgggggtttattactgctttcaaggttcacatggtccctacacc
tttgaggagggaccaaggtggagatcaaacgt

SEQ ID n.º 83 <Q13433; proteína

MARKLSVILI LTFALSVTNP LHELKAAAFP QTTEKISPNW
ESGINVDLAI STRQYHLQQL FYRYGENNSL SVEGFRKLLQ
NIGIDKIKRI HIHHDHDHHS DHEHSDHER HSDHEHHSEH
EHSDHDHHS HHNHAASGKN KRKALCPDHD SDSSGKDPRN
SQGKGAHRPE HASGRRNVKD SVSASEVTST VYNTVSEGTH
FLETIETPRP GKLFPKDVSS STPPSVTSKS RVSRLAGRKT
NESVSEPRKG FMYSRNTNEN PQECFNASKL LTSHGMGIQV
PLNATEFNYL CPAIINQIDA RSCLIHTSEK KAEIPPKTYS
LQIAWVGGFI AISIISFSL LGVILVPLMN RVFFKFLLSF
LVALAVGTLS GDAFLHLLPH SHASHHSHS HEEPAMEMKR
GPLFSLSSQ NIEESAYFDS TWKGLTALGG LYFMFLVEHV
LTLIKQFKDK KKNQKQKPN DDDVEIKKQL SKYESQLSTN
EEKVDTDRT EGYLRADSQE PSHFDSQQPA VLEEEVMIA
HAHPQEVYNE YVPRGCKNKC HSHFHDTLGQ SDDLIIHHHD
YHHILHHHHH QNHHPHSHSQ RYSREELKDA GVATLAWMVI
MGDGLHNFSD GLAIGAAFTE GLSSGLSTSV AVFCHELPHE
LGDFAVLLKA GMTVKQAVLY NALSAMLAYL GMATGIFIGH
YAENVSMWIF ALTAGLFMYV ALVDMVPEML HNDASDHGCS
RWGYFFLQNA GMLLGFGIML LISIFEHKIV FRINF

SEQ ID n.º 84 <AAA96258.2; proteína

ES 2 620 264 T3

MARKLSVILI LTFALSVTNP LHELKAAAFP QTTEKISPNW
 ESGINVDLAI STRQYHLQQL FYRYGENNSL SVEGFRKLLQ
 NIGIDKIKRI HIHHDHDHHS DHEHHS DHER HSDHEHHS DH
 EHSDHNHAA SGKNKRKALC PDHSDSSGK DPRNSQGKGA
 HRPEHASGRR NVKDSVSASE VTSTVYNTVS EGFHLETIE
 TPRPGKLFPK DVSSSTPPSV TSKSRVSRLA GRKTNESVSE
 PRKGFMYSRN TNENPQECFN ASKLLTSHGM GIQVPLNATE
 FNYLCPAIIN QIDARSCLIH TSEKKAIEIPP KTYSLQIAWV
 GGFI AISIIS FL SLLGVILV PLMNRVFFKF LLSFLVALAV
 GTLSGDAFLH LLPHSHASHH HSHSHEEPAM EMKRGPLFSH
 LSSQNI EESA YFDSTWKGLT ALGGLYFMFL VEHVLT LIKQ
 FKDKKKKNQK KPENDDVEI KKQLSKYESQ LSTNEEKVDT
 DDRTEGYLRA DSQEPSHFDS QQPAVLEEEE VMIAHAHPQE
 VYNEYVPRGC KNKCHSHFHD TLGQSDDL IH HHHDYHHILH
 HHHHQNHHP SHSQRSREE LKDAGVATLA WMVIMGDGLH
 NFSDGLAIGA AFTEGLSSGL STSVAVFCHE LPHELGDFAV
 LLKAGMTVKQ AVLYNALSAM LAYLGMATGI FIGHYAENVS
 MWIFALTAGL FMYVALVDMV PEMLHNDASD HGCSRWGYFF
 LQAGMLLGF GIMLLISIFE HKIVFRINF

SEQ ID n.º 85 >LIV-1 de macaco cangrejero

MARKLSVILILTF T LSVTNPLHELKSAAAFPQTTEKISPNWESGINVDLAI
 TTROQYHLQQLFYRYGENNSLSVEGFRKLLQNIGIDKIKRIHIHHDHDHSD
 HEHSDHEHHS DHEHHSRHNHAASGKNKRKALCPEHSDSDSSGKDPRNSQGK
 GAHRPEHANGRRNVKDSVSTSEVTSTVYNTVSEGFHLETIETPKLFPKDV
 SSSTPPSVTEKSLVSRLAGRKTNESMSEPRKGFMYSRNTNENPQECFNASK
 LLTSHGMGIQVPLNATEFNYLCPAIINQIDARSCLIH TSEKKAIEIPPKTYS
 LQIAWVGGFI AISIISFLSLLGVILVPLMNRVFFKFLLSFLVALAVGTLSG
 DAFLHLLPHSHASHHHSHSHEEPAMEMKRGPLFSHLSSQNI EESAYFDSTW
 KGLTALGGLYFMFLVEHVLT LIKQFKDKKKKNQK KPENDDVEI KKQLSKY
 ESQ LSTNEEKVDTDDRTEGYLRADDSQEPSHFDSQQPAILEEEEVMIHAHP
 QEVYNEYVPRGCKNKCHSHFHD TLGQSDDL IH HHHDYHHILHHHHHQNHHP
 HSHSQRSREELKDAGIATLAWMVIMGDGLHNFS DGLAIGAAFTEGLSSGL
 STSVAVFCHELPHELGDFAVLLKAGMTVKQAVLYNALSAMLAYLGMATGI F
 IGHYAENVSMWIFALTAGLFMYVALVDMVPEMLHNDASDHGCSRWGYFFLQ
 NAGMLLGF GIMLLISIFEHKIVFRINF

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado contra LIV-1, en donde la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en SEQ ID n.º 52 o 53, y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en SEQ ID n.º 59 o 60.
- 5 2. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en SEQ ID n.º 53, y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos especificada en SEQ ID n.º 60.
- 10 3. El anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la región variable de la cadena pesada madura está fusionada a una región constante de cadena pesada, opcionalmente en donde la región constante de la cadena pesada es una forma mutante de la región constante natural de humano que tiene una fijación reducida a un receptor de Fcγ con respecto a la región constante natural de humano, y la región variable de la cadena ligera madura está fusionada a una región constante de cadena ligera.
- 15 4. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la región constante de la cadena pesada es del isotipo IgG1.
5. El anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en donde la región constante de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 44 o la SEQ ID n.º 46, y la región constante de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID n.º 42.
- 20 6. El anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico o citostático.
7. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el agente es una auristatina.
8. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el agente es MMAE.
9. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el agente es MMAF.
10. Un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican una región variable de cadena pesada madura y una región variable de cadena ligera madura tal y como está definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 11. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para ser usado en el tratamiento de un paciente que tiene o que está en riesgo de tener cáncer, opcionalmente en donde el cáncer es un cáncer de mama, un cáncer de próstata, un cáncer de cuello uterino o un melanoma.
12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

30

ES 2 620 264 T3

```

                10      20      30      40      50
hLiv-14 HA  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT EY
hLiv-14 HB  .....IE.....
hLiv-14 HC  .....
hLiv-14 HD  .....F.....
hLiv-14 HE  .....FNIE.....I.....
BR2-14a    ...Q...LVRS...L..T..FNIE.....K.R.K....I.....
CDRs      *****

                60      70      80      90      100     110
hLiv-14 HA  APTFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARHDAH YGTWFA YWGQGLTVTVSS
hLiv-14 HB  .....N.....
hLiv-14 HC  .....KA...A.....
hLiv-14 HD  .....NV.....
hLiv-14 HE  .....KA...A...N.....NV.....
BR2-14a    .....KA...A...SN...LQ..S.T.E.....NV.....A
CDRs      *****

                10      20      30      40      50
hLiv-14 LA  DVVMTQSP LSLPVT LGQPASISCRSSQS IIRNDGNTYLEW FQQRPGQSP RRLIYRVSNRF
hLiv-14 LB  .....Y.....
hLiv-14 LC  .....L.....
hLiv-14 LD  .....K.....
hLiv-14 LE  .....L.....
hLiv-14 LF  .....YL.K....KL.....
BR2-14a    ..L...T.....S..DQ.....YL.K....KL.....
CDRs      *****

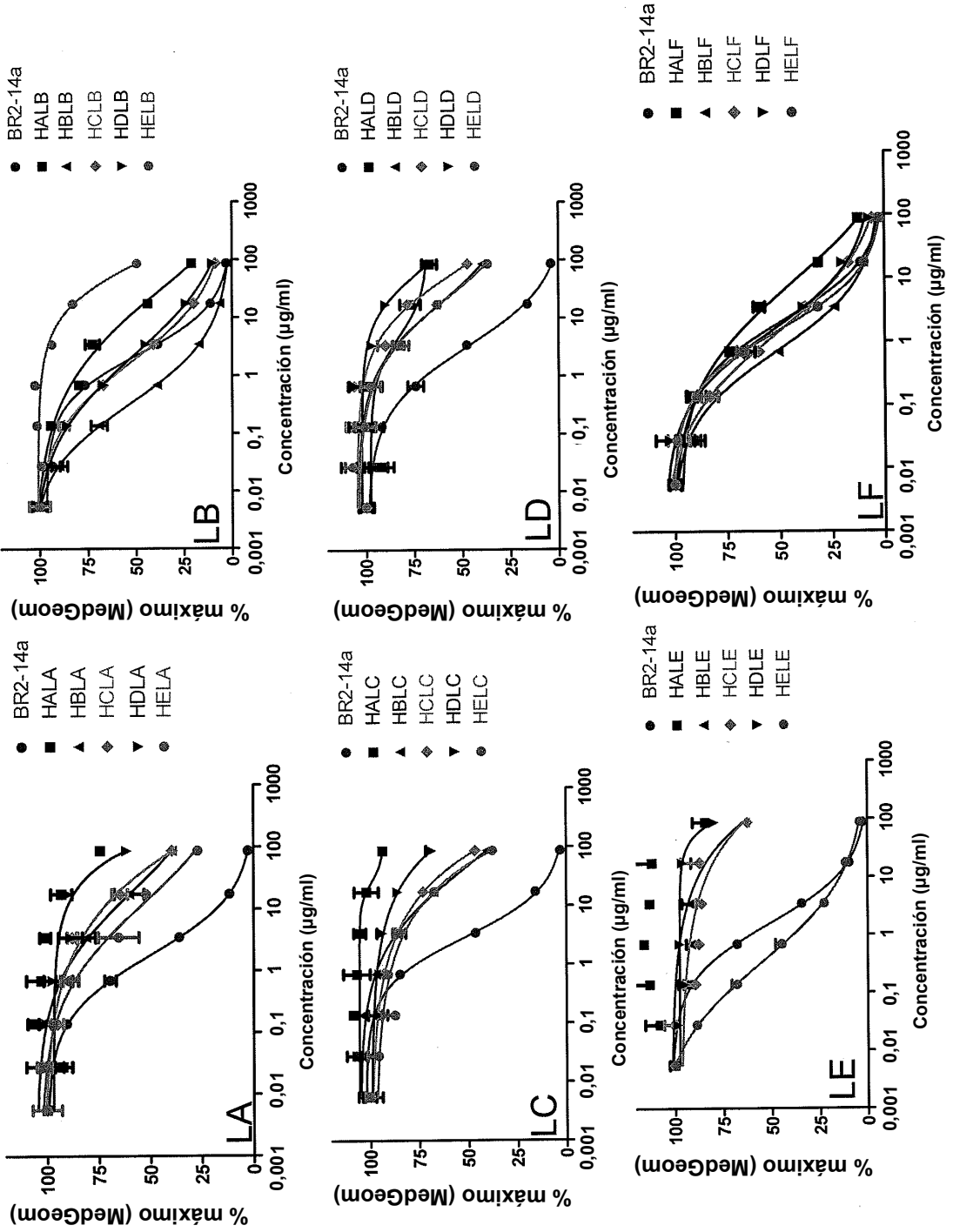
                60      70      80      90      100
hLiv14 LA  SGVPDRFSGSGS GTFDLTKISRVEAEDVGVYYCFQGS HV P YTFGGG TKVEIKR
hLiv14 LB  .....
hLiv14 LC  .....
hLiv14 LD  .....
hLiv14 LE  .....
hLiv14 LF  .....
BR2-14a    .....L.....L.....
CDRs      * *****

```

FIGURA 1

Fijación de antígeno por los anticuerpos BR2-14a humanizados

FIGURA 2



Fijación competitiva sobre las células MCF-7 de la ATCC

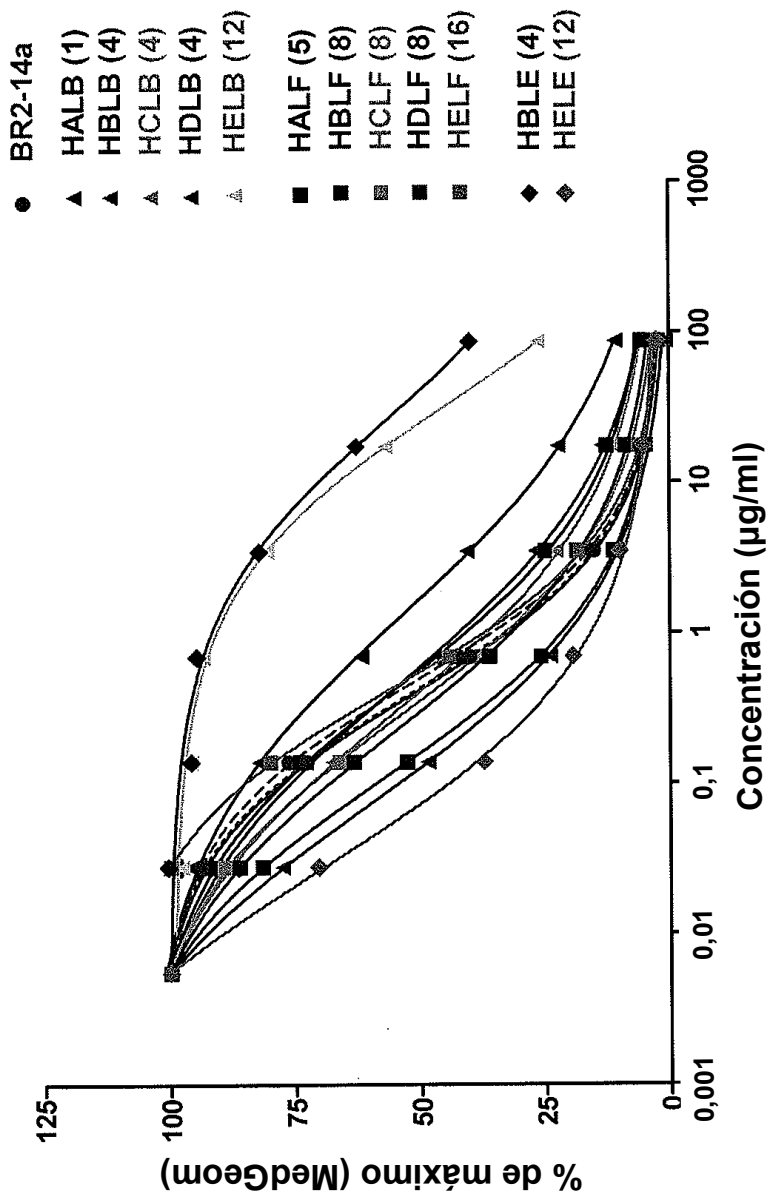


FIGURA 3

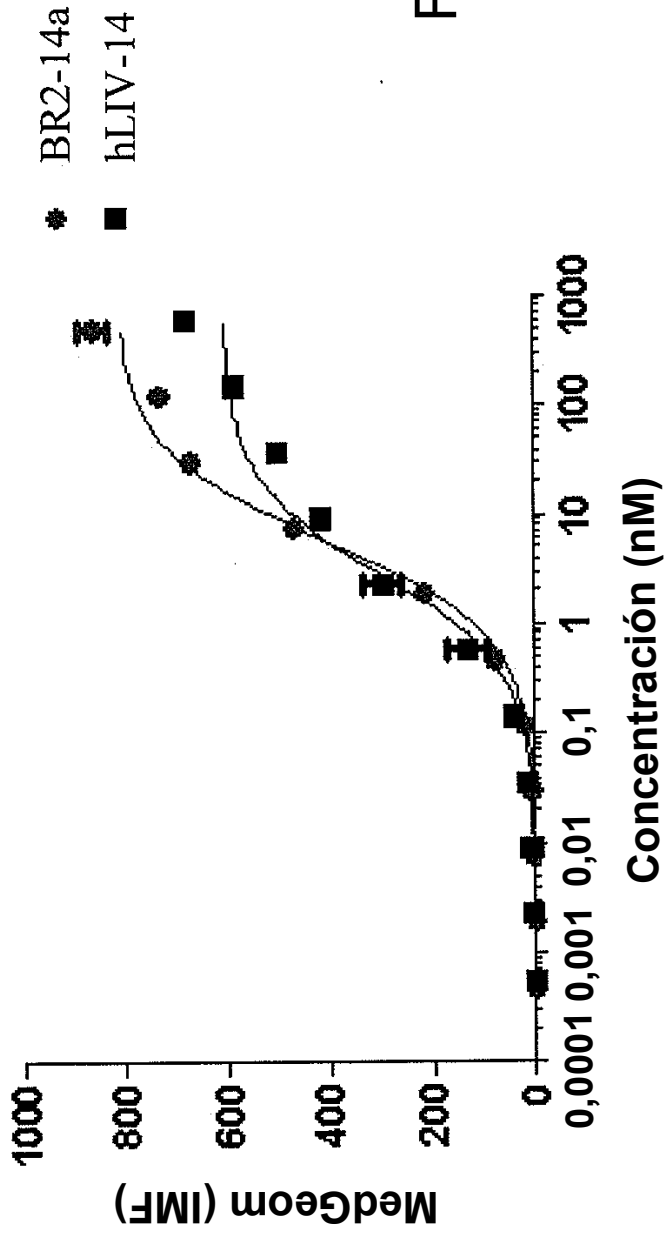


FIGURA 4

	BR2-14a	hLIV-14
Kd (nM)	5,8	2,9
Kd (µg/ml)	0,8	0,4

Fijación competitiva sobre el conjunto de CHO hLIV1

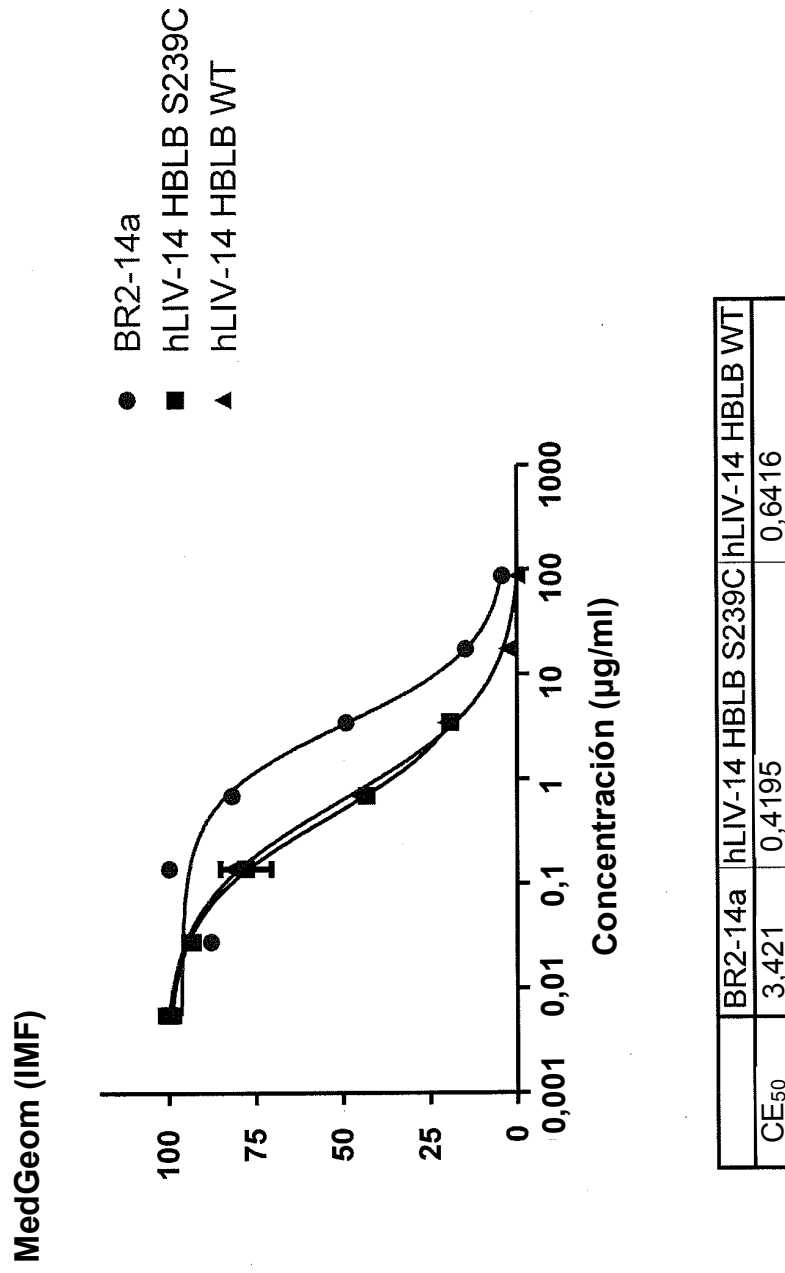


FIGURA 5

Expresión alta de LIV-1 en los cánceres de mama tras el tratamiento hormonal

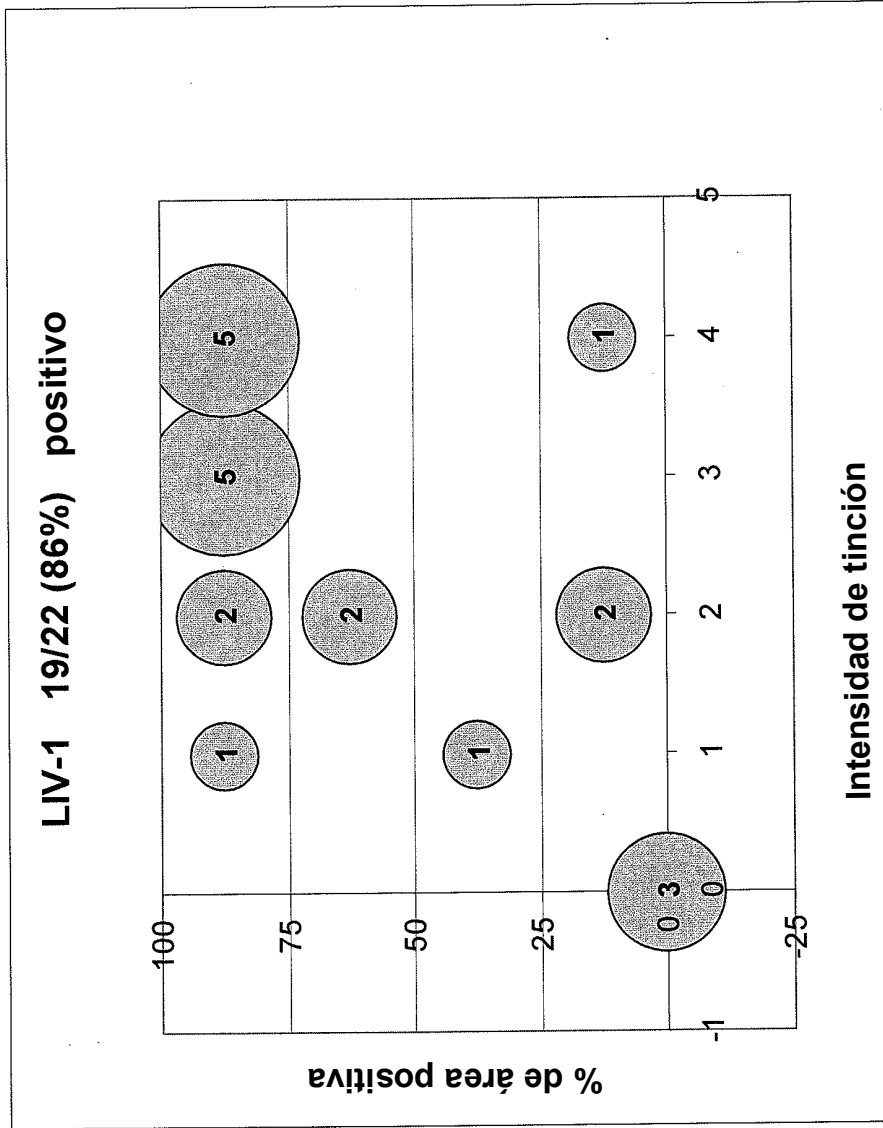


FIGURA 6

- Muestras de lesiones primarias y metastásicas de pacientes tratados anteriormente con tratamiento hormonal, que incluye tamoxifeno e inhibidores de la aromatasas
- Muestras de tejido de 5 fuentes comerciales

Expresión de LIV-1 en el cáncer de próstata metastásico insensible a hormonas (clasificado por sitios)

LIV-1		#	%
Número total de muestras+ (intensidad 1-4+)		36/50	72
Metástasis ósea		15/25	60
Metástasis en partes blandas		21/25	82

FIGURA 7

Expresión de LIV-1 en casos de cáncer de mama triple negativo

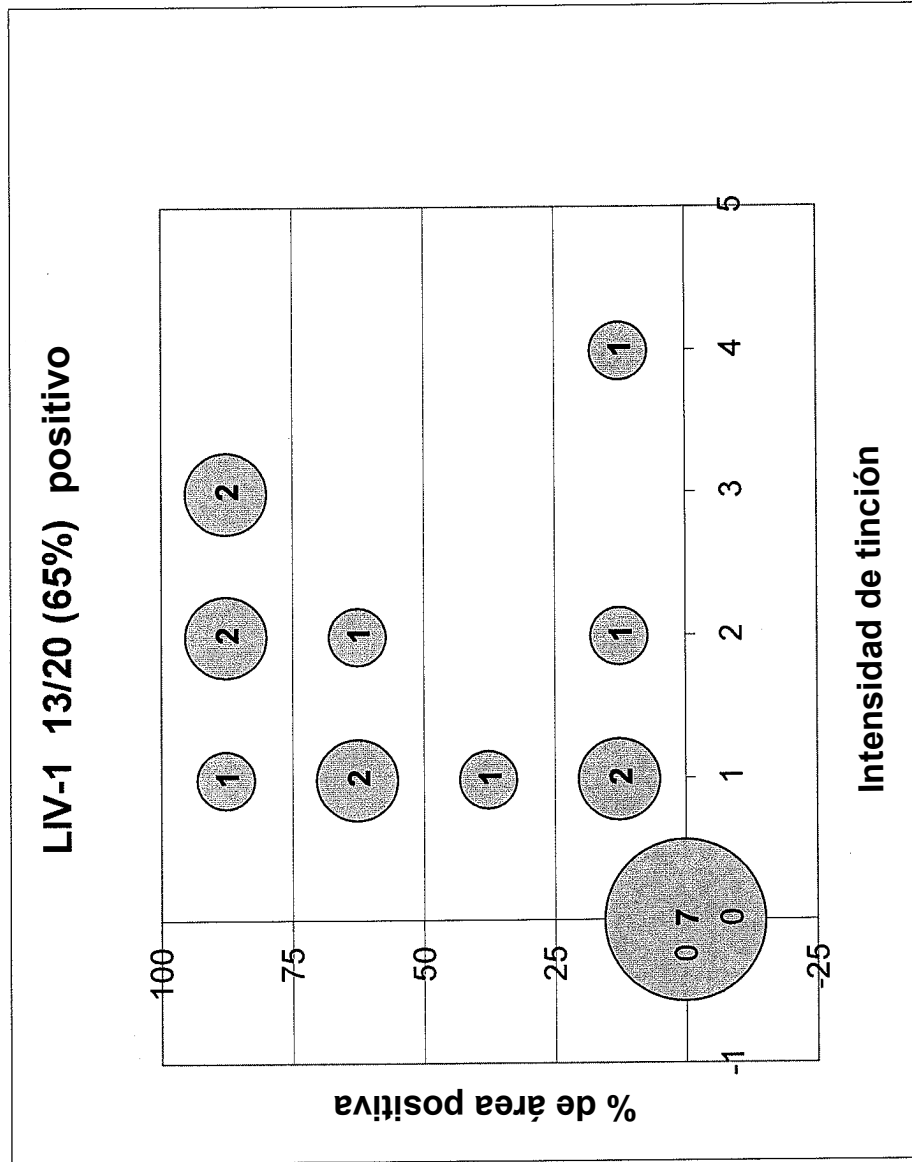
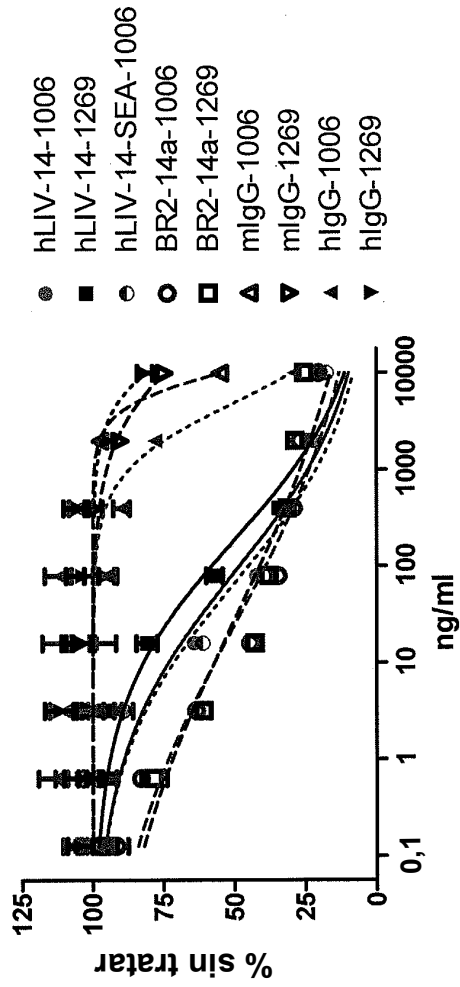


FIGURA 8

Actividad citotóxica del CFA contra hLIV-14 en las células MCF-7 (ATCC). Tratamiento de 144 horas

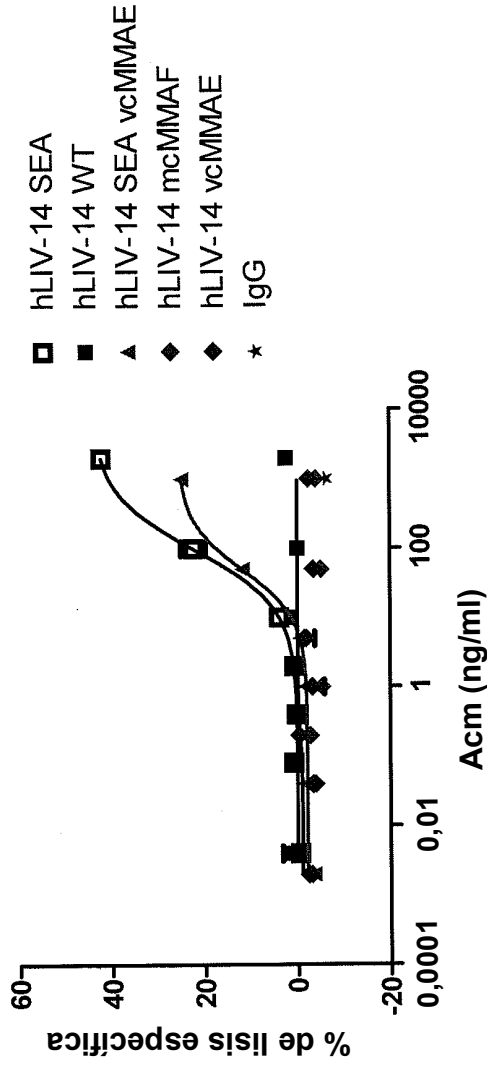


	hLIV-14-1006	hLIV-14-SEA-1006	BR2-14a-1-1006	hlgG-1006	mlgG-1006	hLIV-14-1269	BR2-14a-1269	hlgG-1269	mlgG-1269
C ₅₀ ng/ml	91	91	20	>10 000	4786	195	20	>10 000	>10 000

FIGURA 9

Actividad de CCDA: SEA y CFA contra hLIV14 (donante 1)

Diana: MCF-7 (ATCC) Donante: 2076181 (158V/V)

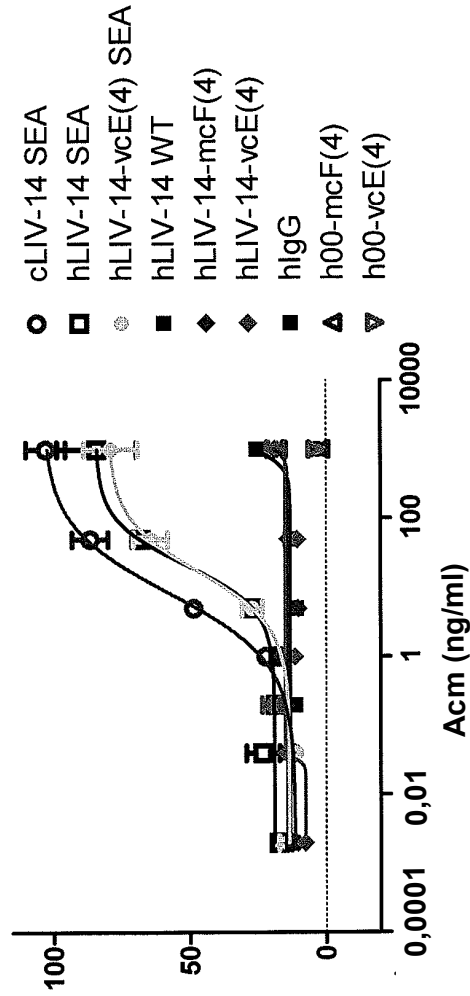


	Cl ₅₀ (ng/ml)	Lisis máxima
hLIV-14 SEA	97,1	44%
hLIV-14 SEA vcMMAE	49,9	26%

FIGURA 10

Actividad de CCDA: SEA y CFA contra hLIV14 (donante 2)

Diana: MCF-7 (ATCC) Donante: PO16 (158VIV)



	Cl ₅₀ (ng/ml)	Lisis máxima
hLIV-14 SEA	21,8	85%
hLIV-14 SEA vcMMAE	17,0	80%

FIGURA 11

Actividad antitumoral del CFA quimérico contra LIV-14 sobre el carcinoma de mama MCF7 en ratones atómicos

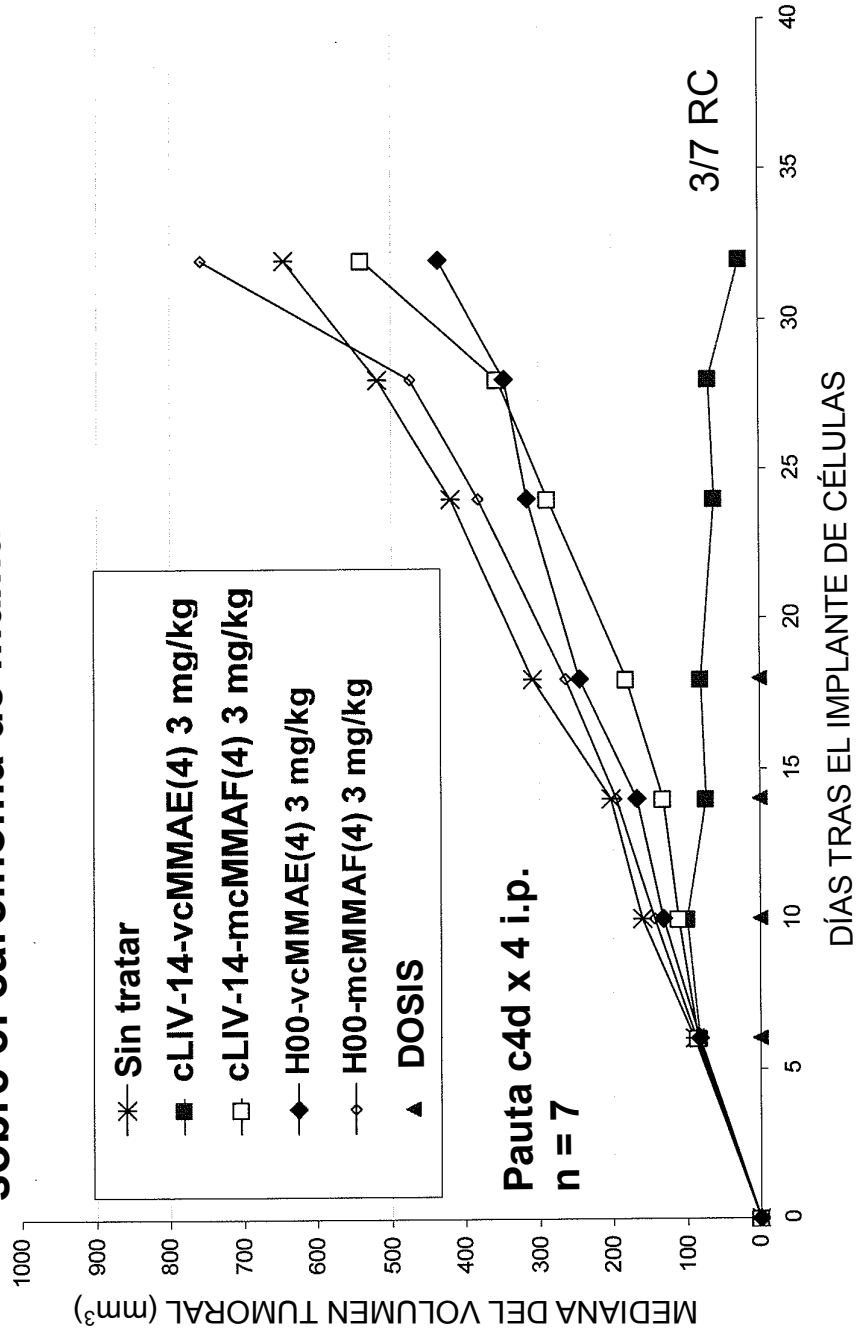


FIGURA 12

Actividad antitumoral de LIV-14-vcMMAE quimérico sobre el carcinoma de próstata PC3 (ATCC) en los ratones macho atímicos

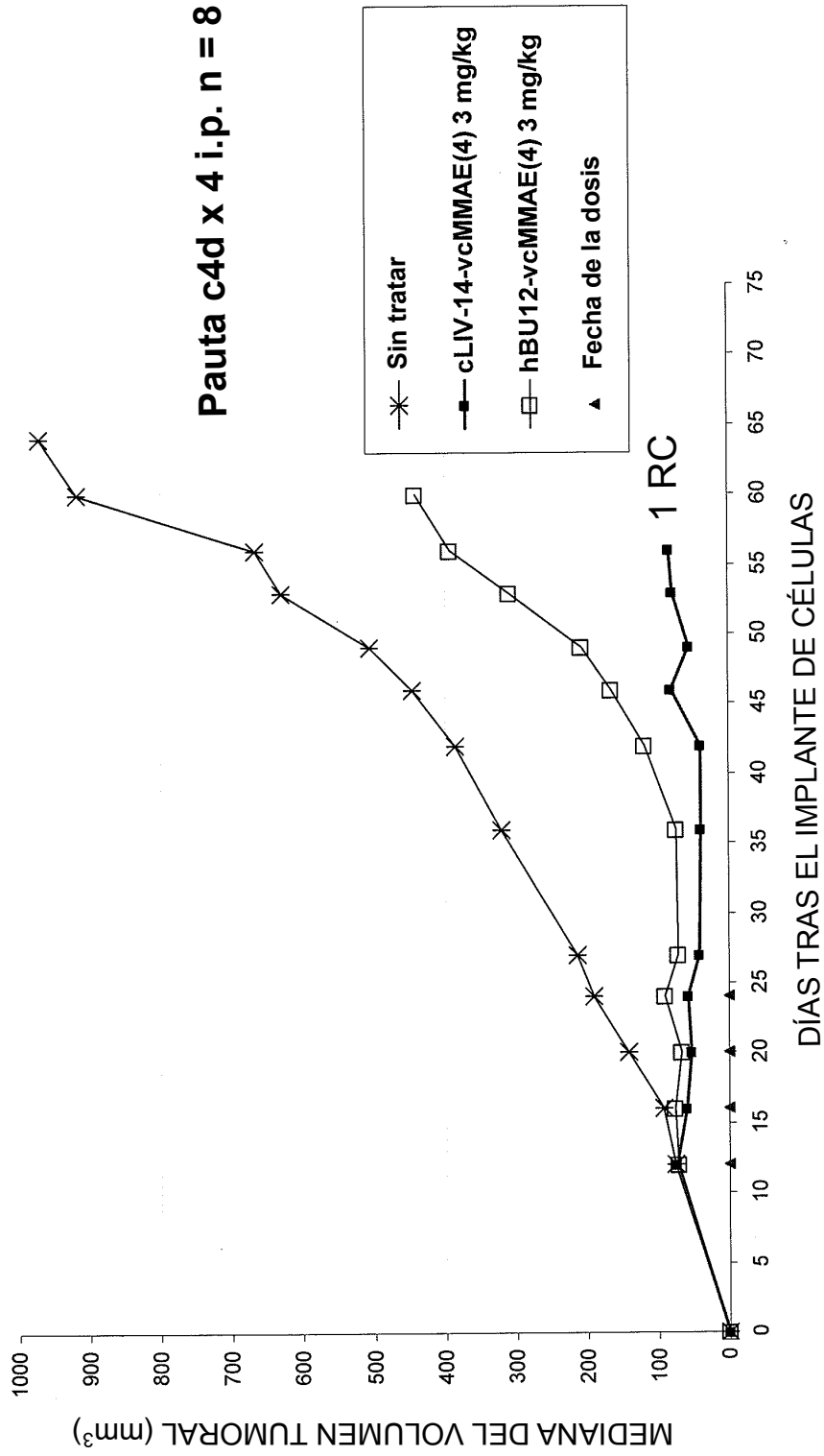


FIGURA 13

FIGURA 14
Actividad del CFA humanizado contra LIV-14 sobre tumores del carcinoma de mama MCF7 (NCI) en los ratones atímicos

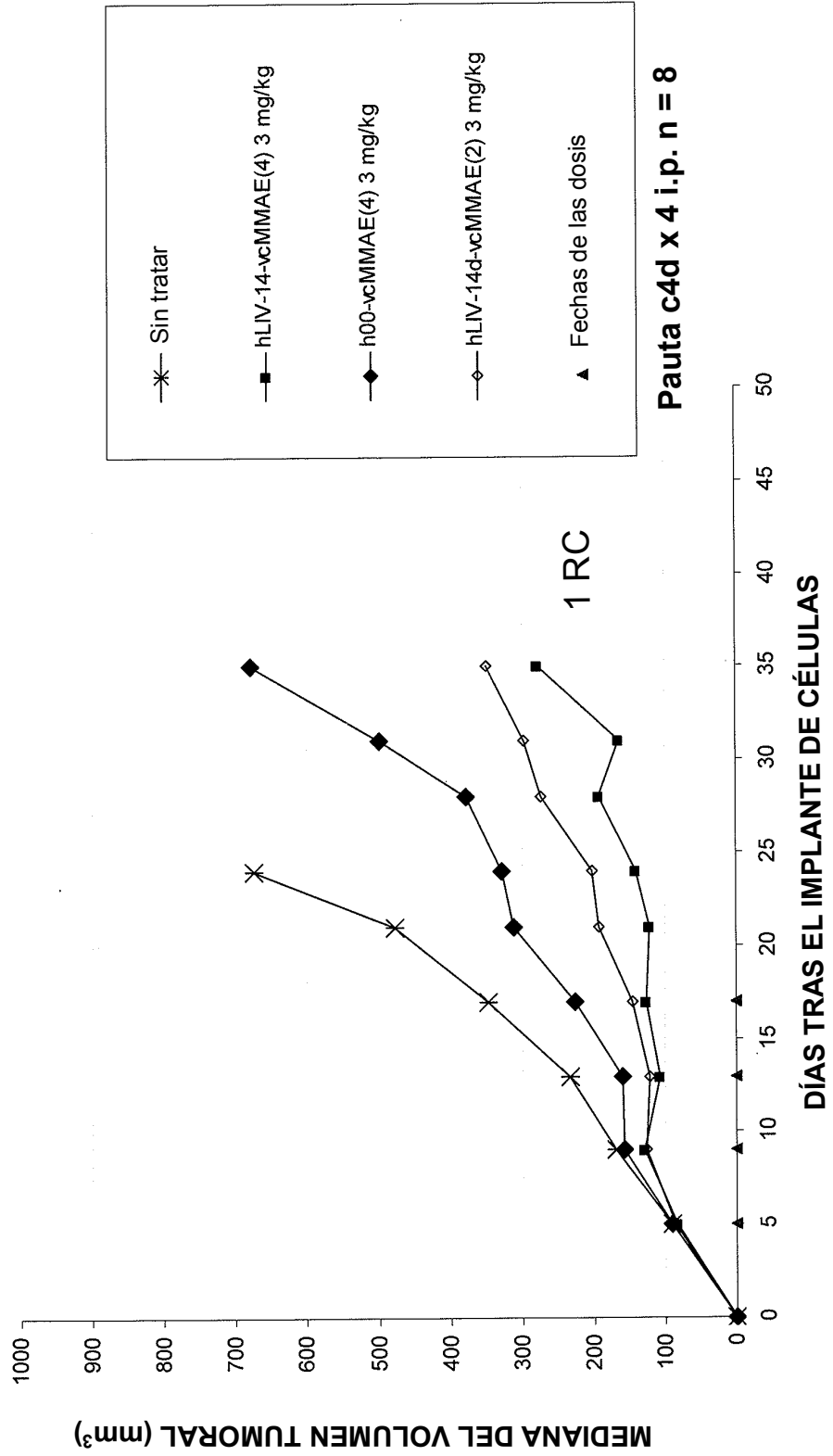
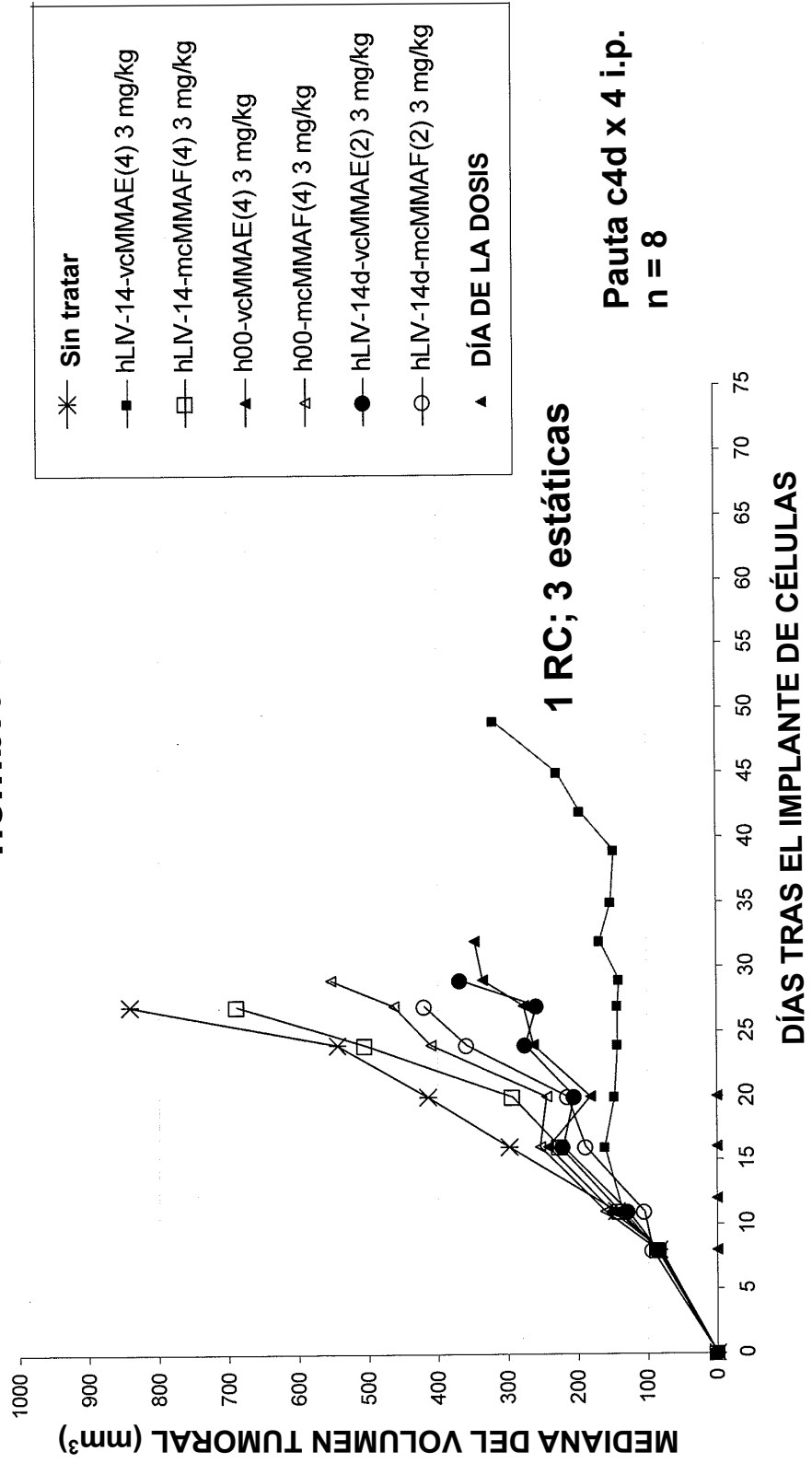


FIGURA 15
Actividad del CFA humanizado contra LIV-14 sobre tumores
del carcinoma de próstata PC3 (DSMZ) en las ratonas
hembra atímicas



ES 2 620 264 T3

```

                10      20      30      40      50
hLiv22 HA  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT EY
hLiv22 HB  .....IE.....
hLiv22 HC  .....
hLiv22 HD  .....L.....
hLiv22 HE  .....LNIE.....I.....
hLiv22 HF  .....L.IE.....
hLiv22 HG  .....L.IE.....
mLiv22 H   E...Q...LVRS...L..T...LNIE.....K.R.E.....I.....
CDRs      *****
                60      70      80      90      100     110
hLiv22 HA  GPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVVYCARHNAHYGTWFAYWGQGLVTVSS
hLiv22 HB  .....N.....
hLiv22 HC  .....KA...A.....
hLiv22 HD  .....TV.....
hLiv22 HE  .....KA...A...N.....TV.....
hLiv22 HF  .....V.....
hLiv22 HG  .....N.....V.....
mLiv22 H   .....KA...A...SN...LQ..S.T.G.....TV.....A
CDRs      *****

```

FIGURA 16A

ES 2 620 264 T3

```

hLiv22 LF .....YL.....KP.....
hLiv22 LG .....Y.....P.....
mLiv22 L ..L...T.....S..DQ.....YL.....KP.....
CDRs .....*****.....*****

          60          70          80          90          100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
hLiv22 LA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPYTFGGGTKVEIKR
hLiv22 LB .....
hLiv22 LC .....
hLiv22 LD .....
hLiv22 LE .....
hLiv22 LF .....
hLiv22 LG .....
mLiv22 L .....L.L.....L.....
CDRs * .....*****

```

FIGURA 16B

Ronda 2 de humanización para la fijación del antígeno al hLIV22 agrupada por la cadena H

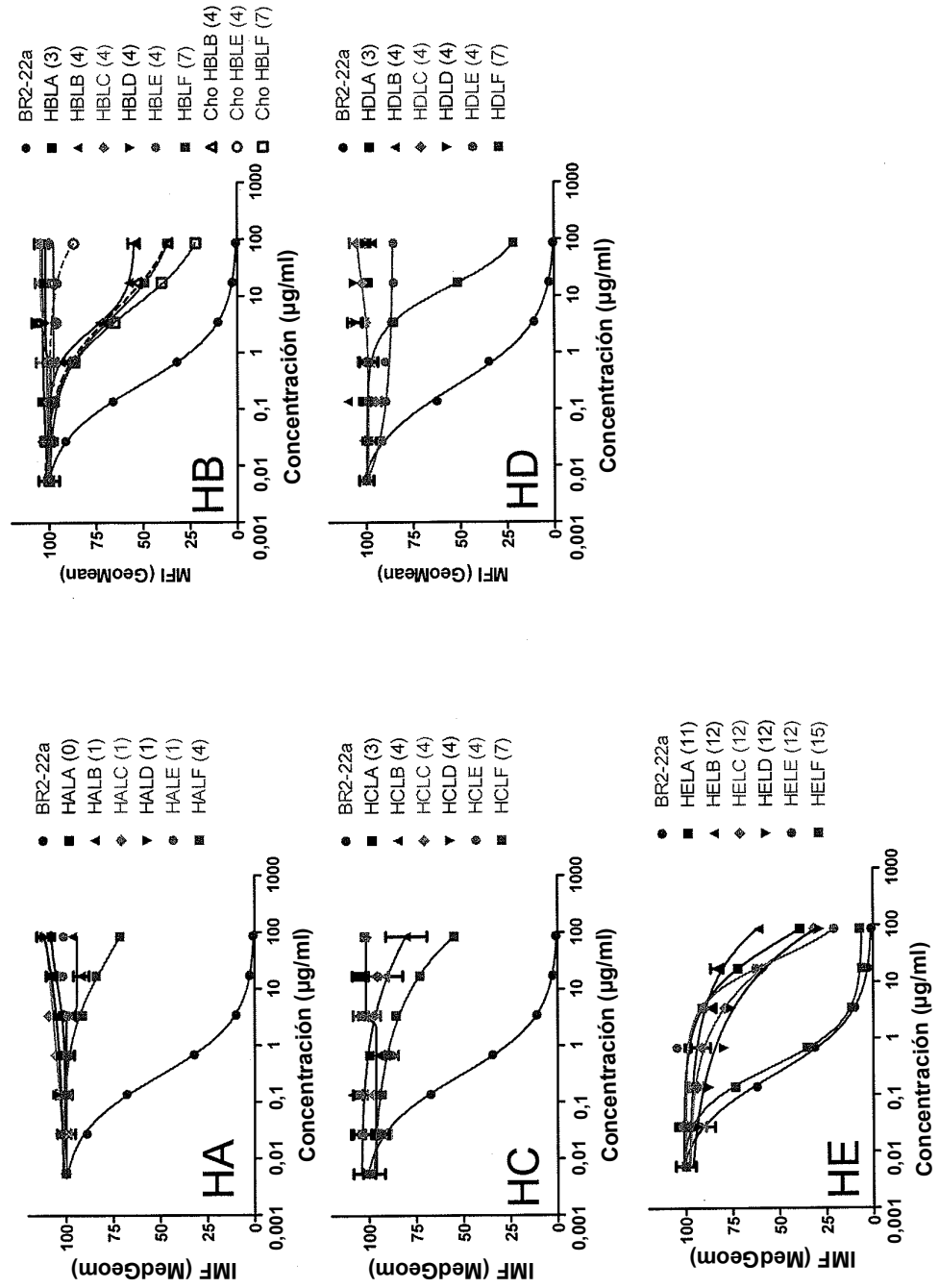


FIGURA 17

Retromutaciones de LIV22 (ronda 2)

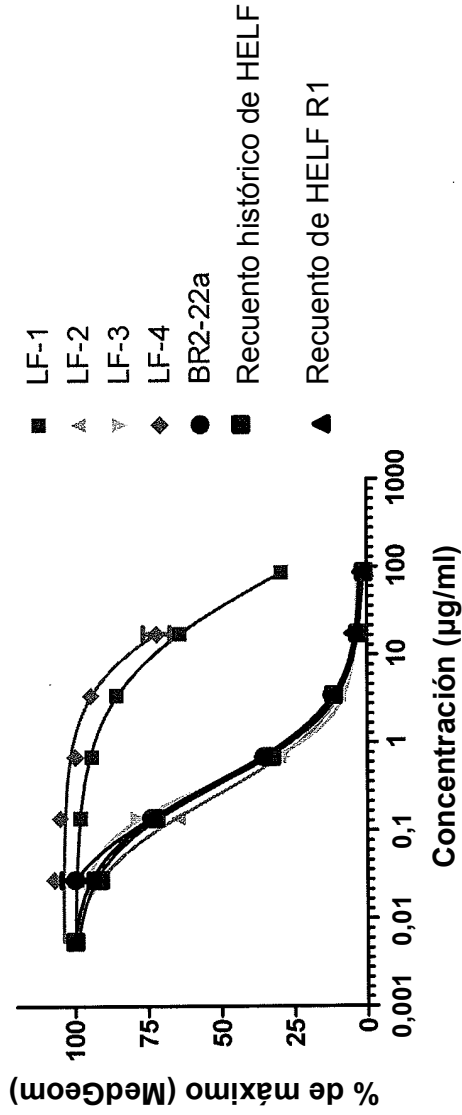
	N.º de retromutaciones													N.º de retromutaciones	
L36	L46	0	HA	H27	H28	H29	H30	H48	H66	H67	H71	H76	H93	H94	0
LA	R			Y	T	F	T	M	R	V	R	S	A	R	
LB	R	1	HB	Y	T	I	(E)	M	R	V	R	N	A	R	3
LC	R	1	HC	Y	T	F	T	M	K	A	A	S	A	R	3
LD	R	1	HD	L	T	F	T	M	R	V	R	S	I	V	3
LE	R	1	HE	L	N	I	(E)	I	K	A	A	N	I	V	11
LF	K	4													

Mutaciones adicionales de LIV22 (ronda 3)

	N.º de retromutaciones													N.º de retromutaciones	
L36	L46	4	HE	H27	H28	H29	H30	H48	H66	H67	H71	H76	H93	H94	11
LF	P			L	N	I	(E)	I	K	A	A	N	I	V	
LF-1	P	3	HE-1	Y	N	I	(E)	I	K	A	A	N	I	V	10
LF-2	P	3	HE-2	L	T	I	(E)	I	K	A	A	N	I	V	10
LF-3	P	3	HE-3	L	N	F	(E)	I	K	A	A	N	I	V	10
LF-4	R	3	HE-4	L	N	I	T	I	K	A	A	N	I	V	10
	R		HE-5	L	N	I	(E)	M	K	A	A	N	I	V	10
			HE-6	L	N	I	(E)	I	R	A	A	N	I	V	10
			HE-7	L	N	I	(E)	I	K	V	A	N	I	V	10
			HE-8	L	N	I	(E)	I	K	A	R	N	I	V	10
			HE-9	L	N	I	(E)	I	K	A	A	S	I	V	10
			HE-10	L	N	I	(E)	I	K	A	A	N	A	V	10
			HE-11	L	N	I	(E)	I	K	A	A	N	I	R	10

FIGURA 18

Fijación competitiva de hLIV22: LF (ronda 3)



Retromutaciones de LIV22 adicionales: LF

	L36	L37	L45	L46	N.º de retromutaciones
LF	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	4
LF-1	F	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	3
LF-2	Y	Q	<u>K</u>	<u>P</u>	3
LF-3	<u>Y</u>	<u>L</u>	R	<u>P</u>	3
LF-4	Y	<u>L</u>	K	R	3

Restos para mantener la fijación del antígeno:

Y36 (tirosina) y P46 (prolina)

FIGURA 19

Fijación competitiva de hLIV22: HE (ronda 3)

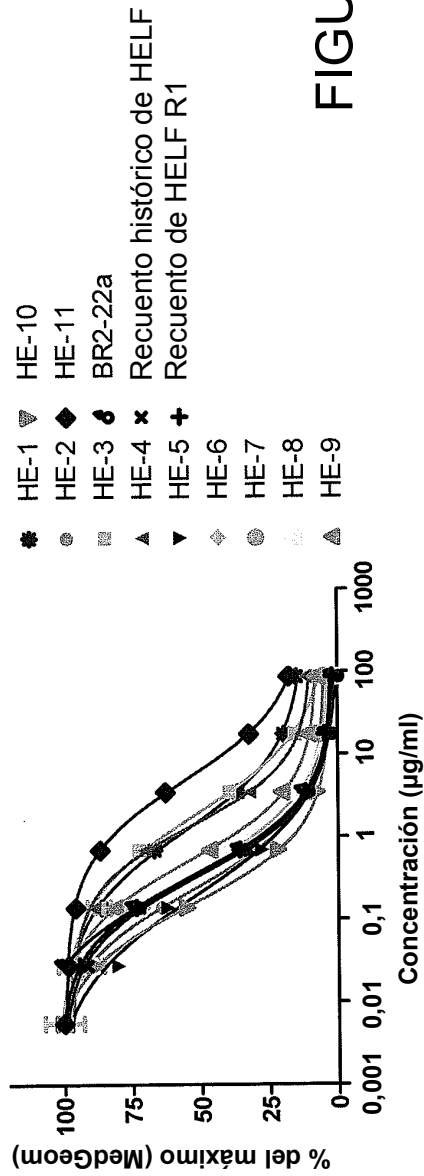


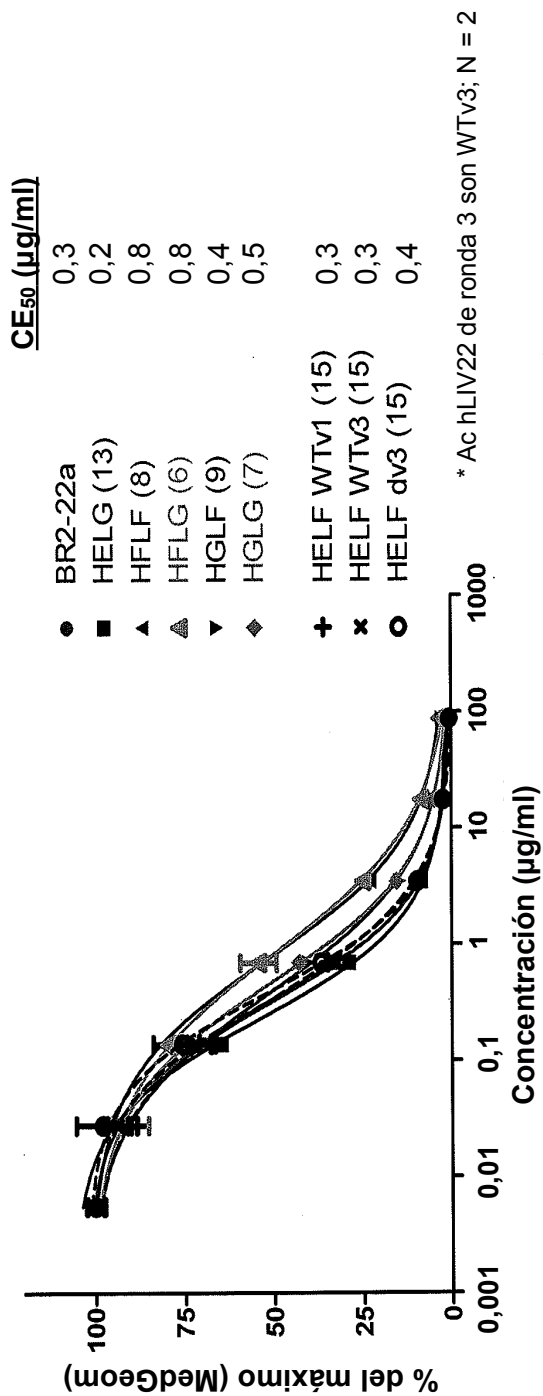
FIGURA 20

Retromutaciones de hLIV22 adicionales: HE

HE	H27	H28	H29	H30	H48	H66	H67	H71	H76	H93	H94	N.º de retromutaciones
HE	L	N	N	E	I	K	A	A	N	I	V	11
HE-1	Y	N	I	E	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-2	L	T	I	E	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-3	L	N	F	E	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-4	L	N	I	T	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-5	L	N	I	E	M	K	A	A	N	I	V	10
HE-6	L	N	I	E	I	R	A	A	N	I	V	10
HE-7	L	N	I	E	I	K	V	A	N	I	V	10
HE-8	L	N	I	E	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-9	L	N	I	E	I	K	A	A	S	I	V	10
HE-10	L	N	I	E	I	K	A	A	N	A	V	10
HE-11	L	N	I	E	I	K	A	A	N	I	R	10

Restos para mantener la fijación del antígeno:
 L27 (leucina)
 I29 (isoleucina)
 E30 (ácido glutámico)
 N76 (asparagina)
 V94 (valina)

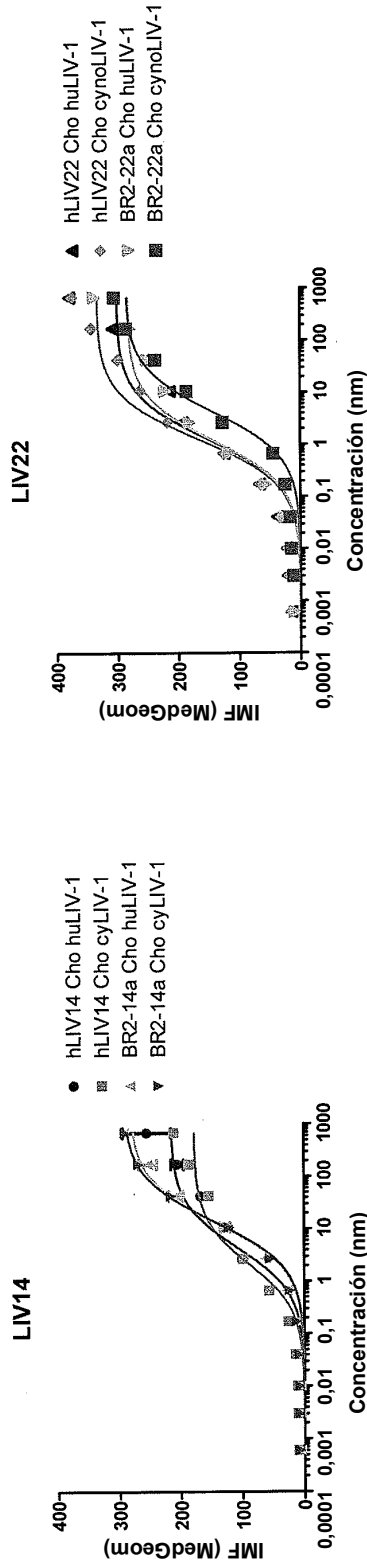
Humanización de LIV22: Ronda 4



	Nº de retromutaciones	CE ₅₀ (µg/ml)
HGLG	7	0,5
HGLF	9	0,4
HFLG	6	0,8
HFLF	8	0,8

FIGURA 21

**Fijación a saturación
AF-647**



Kd aparente (nM) de BR2-14a, BR2-22a, hLIV14 y hLIV22 por el LIV-1 de humano y de macaco cangrejero

Antígeno	BR-14a	hLIV14	BR-22a	hLIV22
LIV1 de humano	12,5	4,3	1,2	1,2
LIV1 de macaco	14,0	2,1	4,2	1,3

Control negativo: m2H12

FIGURA 22

Actividad citotóxica de hLIV22-vcMMAE
 Células MCF-7 (ATCC). Tratamiento de 144 horas

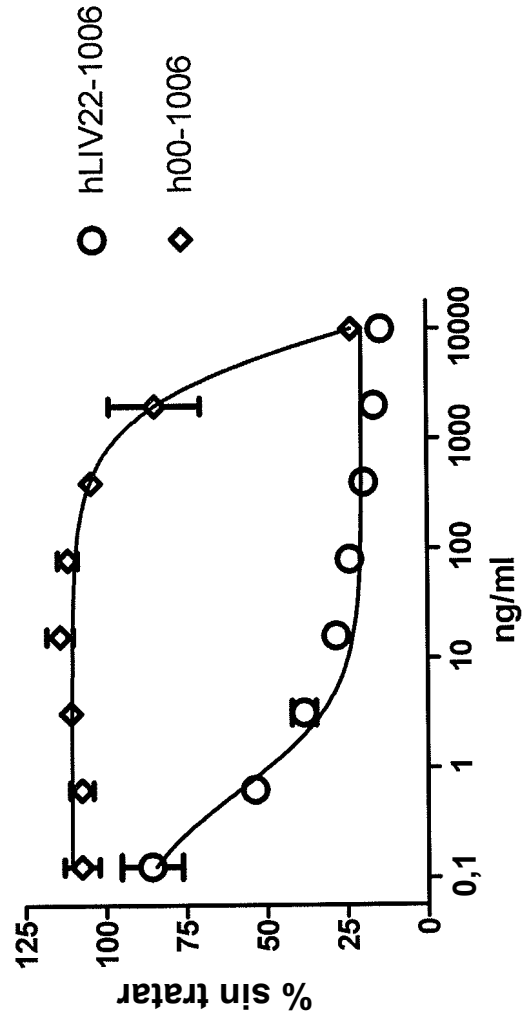


Tabla de CE₅₀. Media de 2 experimentos

	CE ₅₀ (ng/ml)
hLIV22 -1006	0,9
h00 -1006	4981

FIGURA 23

Actividad citotóxica de hLIV22-mcMMAF
 Células MCF-7 (ATCC). Tratamiento de 144 horas

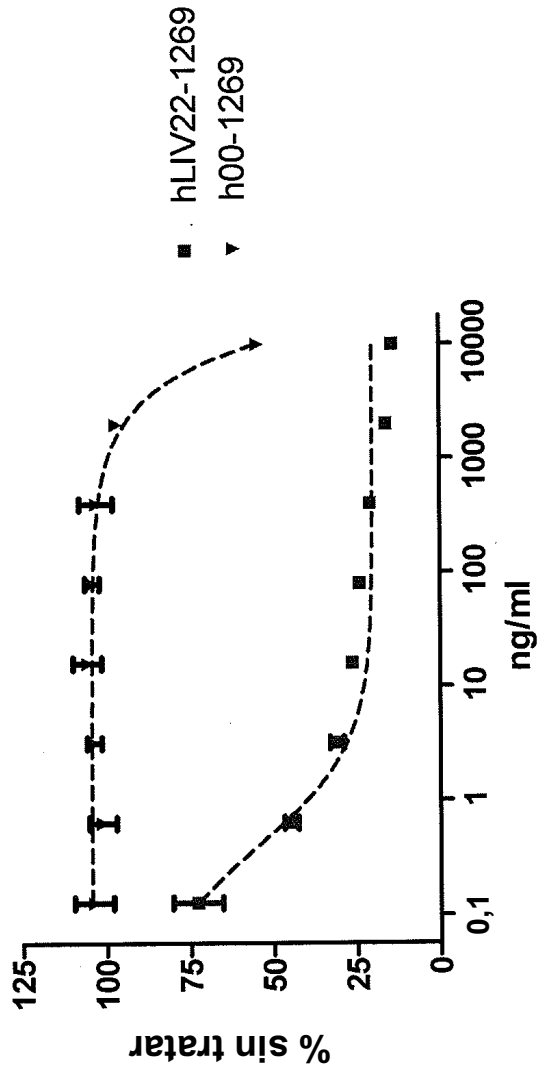


Tabla de CE₅₀. Media de 2 experimentos

CAF -1269	CE ₅₀ (ng/ml)
hLIV22	0,7
h00	>10000

FIGURA 24

Actividad del CFA contra hLIV22 en el modelo del carcinoma de próstata PC3 (DSMZ) en las ratonas hembra atímicas

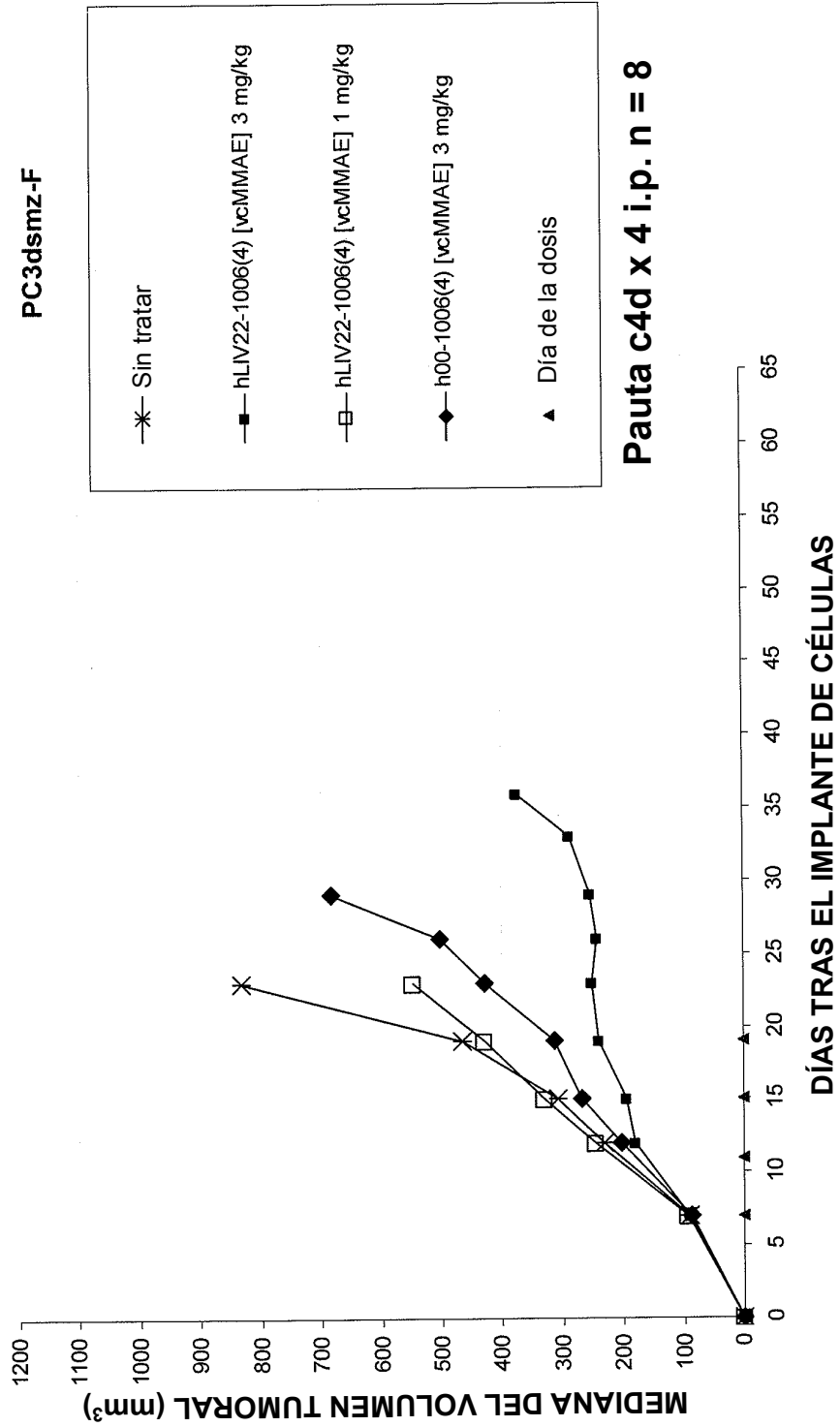
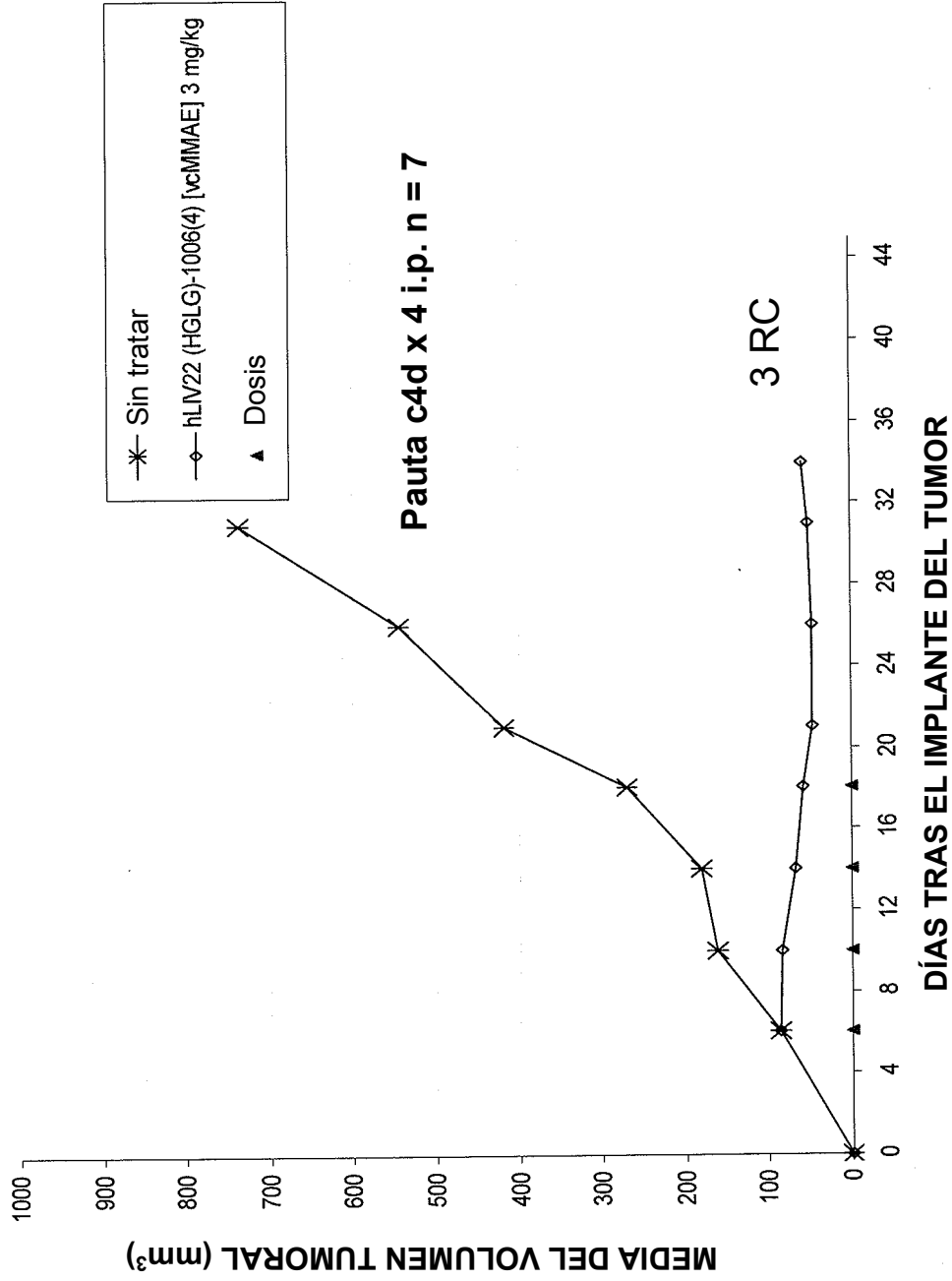


FIGURA 25

Actividad de hLIV22 en tumores del carcinoma de mama MCF7 (NCI) en los ratones atímicos



Estudio terminado debido a la toxicidad de los estrógenos

FIGURA 26

Actividad de hLIV22 (HGLG)-vcMMAE frente a hLIV-14vcE

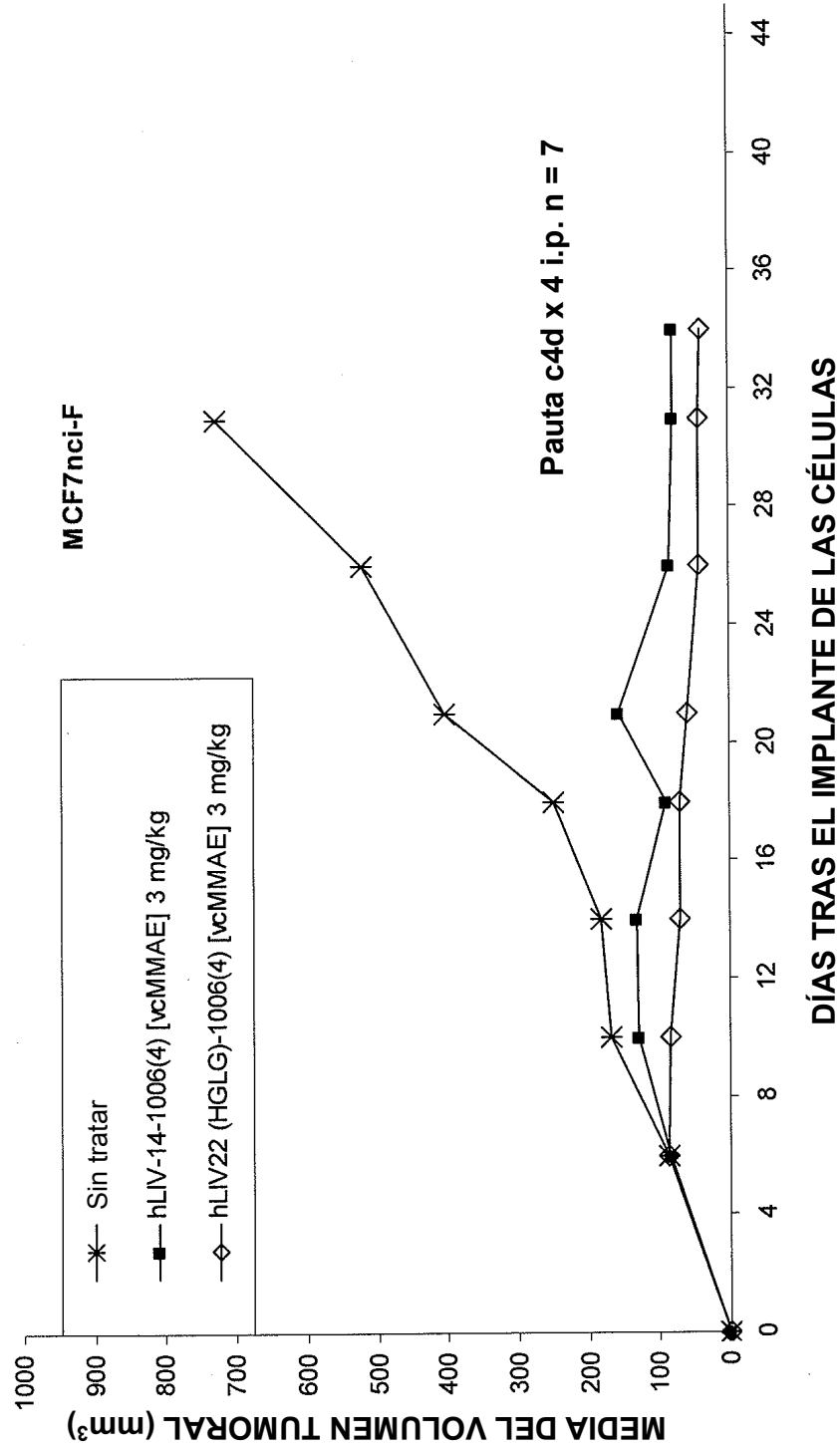


FIGURA 27

Expresión de LIV-1 en biopsias de melanoma

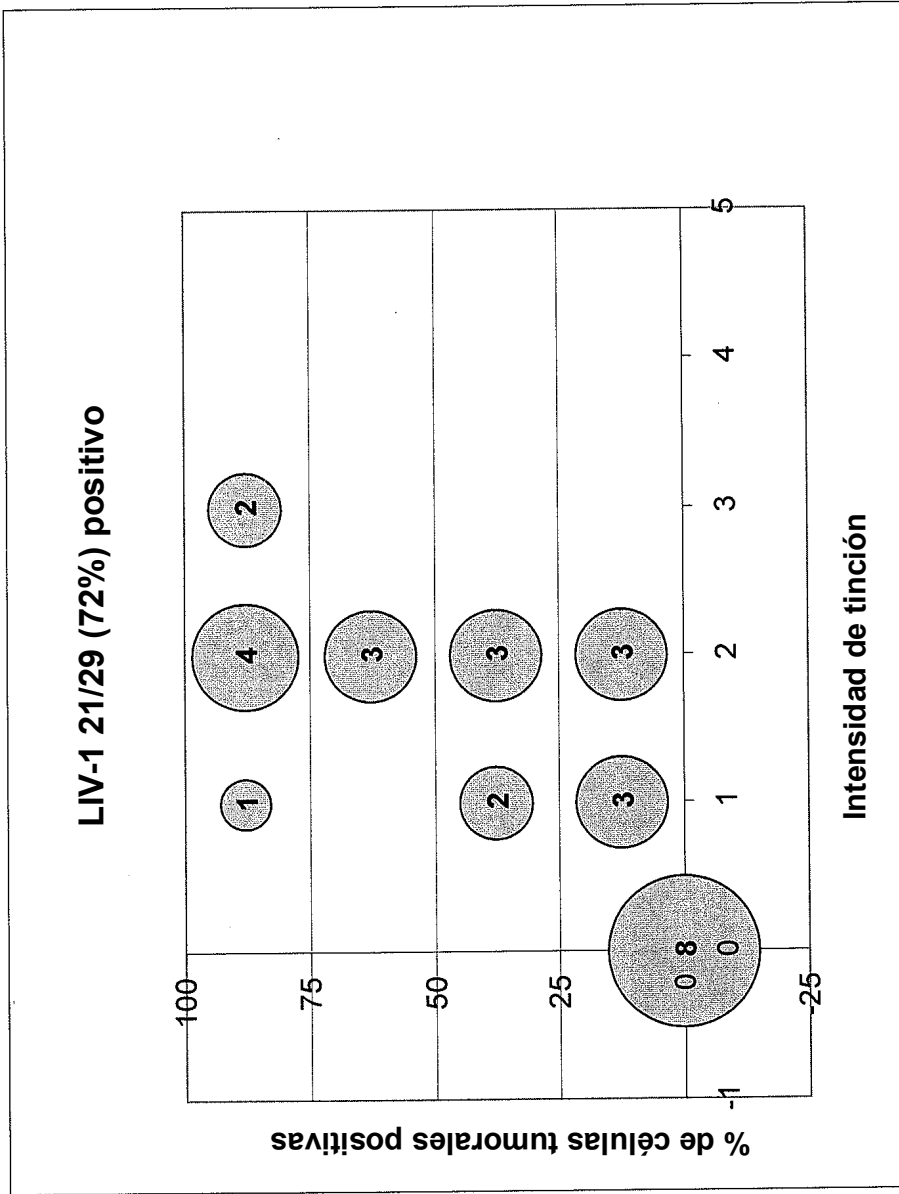


FIGURA 28