

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 342**

15 Folleto corregido: T3

Texto afectado: Descripción

48 Fecha de publicación de la corrección: 06.06.2018

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61N 5/02 (2006.01)

A61N 5/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA CORREGIDA

T9

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 13000027 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2631248**

54 Título: **Tratamiento de tumores usando anticuerpos anti-L1 específicos**

30 Prioridad:

15.06.2007 US 944359 P

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

09.03.2018

73 Titular/es:

**MEDIGENE AG (50.0%)
Lochamer Strasse 11
82152 Planegg/Martinsried, DE y
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 658 342 T9

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de tumores usando anticuerpos anti-L1 específicos

Campo de la invención

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

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

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

Siempre existe una necesidad de agentes anti-tumorales mejorados.

La presente invención se refiere en un aspecto a una molécula de unión capaz de unirse a L1,

(a) siendo seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos monocatenarios, scFv, multímeros de scFv como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, fragmentos de anticuerpos, Fab, TanDabs, Flexibodies, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos quiméricos,

y / o

(b) que comprende al menos un dominio de Ig,

y en el que la molécula de unión capaz de unirse a L1:

(i) se caracteriza porque sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) tienen las siguientes secuencias: LCDR1: RASQDISNYLN (SEQ ID No.: 24), LCDR2: YTSRLHS (SEQ ID No.: 25), LCDR3: QQGNTLPWT (SEQ ID No.: 26), HCDR1: RYWML (SEQ ID No.: 27), HCDR2: EINPRNDRNTYNEKFKT (SEQ ID No.: 28) y HCDR3: GGGYAMDY (SEQ ID No.: 29),

y cuya molécula de unión se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} M, o

(ii) se caracteriza porque sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) tienen las siguientes secuencias: LCDR1: QDISNY (SEQ ID No.: 30), LCDR2: YTS, LCDR3: QQGNTLPWT (SEQ ID No.: 31), HCDR1: GYTFTRYW (SEQ ID No.: 32), HCDR2: INPRNDRT (SEQ ID No.: 33), y HCDR3: ALGGGYAMDY (SEQ ID No.: 34),

y cuya molécula de unión se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} M.

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

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

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

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

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

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

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

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

a) tienen las siguientes secuencias RASQDISNYLNRSQDISNYLN, YTSRLHS, QQGNTLPWT, RYWML, EINPRNDRRTNYNEKFKT, o GGGYAMDY, o

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

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

10

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

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

15

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

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

20

Se describe un anticuerpo monoclonal, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841. Esta célula de hibridoma se depositó en la Colección alemana de microorganismos y células el 25 de abril de 2007 según el tratado de Budapest.

Se describe un anticuerpo humanizado basado en el anticuerpo monoclonal como se describe anteriormente.

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

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

35 En una realización preferida, el anticuerpo humanizado descrito tiene al menos un residuo de CDR no humana y región de marco humano (FR).

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

40

45

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

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

50

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

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

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

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

Se da a conocer que las CDR pueden alterarse, preferiblemente mediante intercambios que conducen a un intercambio de aminoácidos conservativo.

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

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

25 En una descripción adicional, el anticuerpo humanizado comprende la secuencia de L1_9.3hu o L1_9.3hu3 tal como se muestra en la figura 8 a) y b).

Se da a conocer una molécula de unión que comprende:

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

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

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

Se da a conocer una molécula de unión que comprende:

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

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

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

40 La presente invención se refiere en un aspecto a una molécula de unión capaz de unirse a L1,

(a) siendo seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos monocatenarios, scFv, multímeros de scFv como dímeros, trímeros o tetrameros, fragmentos de anticuerpos, Fab, Tandabs, Flexibodies, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos quiméricos,

y / o

45 (b) que comprende al menos un dominio de Ig,

y en el que la molécula de unión capaz de unirse a L1:

(i) se caracteriza porque sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) tienen las siguientes secuencias: LCDR1: RASQDISNYLN (SEQ ID No.: 24), LCDR2: YTSRLHS (SEQ ID

No.: 25), LCDR3: QQGNTLPWT (SEQ ID No.: 26), HCDR1: RYWML (SEQ ID No.: 27), HCDR2: EINPRNDRRTNYNEKFKT (SEQ ID No.: 28), y HCDR3: GGGYAMDY (SEQ ID No.: 29),

y cuya molécula de unión se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} M, o

5 (ii) se caracteriza porque sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) tienen las siguientes secuencias: LCDR1: QDISNY (SEQ ID No.: 30), LCDR2: YTS, LCDR3: QQGNTLPWT (SEQ ID No.: 31), HCDR1: GYTFTRYW (SEQ ID No.: 32), HCDR2: INPRNDRT (SEQ ID No.: 33), y HCDR3: ALGGGYAMDY (SEQ ID No.: 34),

y cuya molécula de unión se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} M.

10 De acuerdo con la invención, una molécula es una molécula que puede unirse a L1. La molécula de unión es una molécula que comprende inmunoglobulina, es decir, comprende al menos un dominio de Ig, y/o la molécula de unión de la invención se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, scFv, multímeros de diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos similares a scFv, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab), TandAbs, Flexibodies, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos quiméricos).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

dos tipos diferentes de anticuerpos contra dos antígenos diferentes (Kurokawa, T. et al., *Biotechnology* 7,1163 (1989)).

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

La molécula de unión de la invención se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} ó 10^{-11} M.

Preferiblemente, el anticuerpo no se une significativamente a otros miembros de la familia de proteínas de L1, tales como, por ejemplo, CHL1 (homólogo cercano de L1, número de registro NM_006614), NrCAM (proteína de adhesión a células neuronales, número de registro NM_001037132 o NM_005010) y/o NFASC (neurofascina, número de registro NM_015090). Preferiblemente, el anticuerpo se une a los otros miembros de la familia de L1 con una afinidad al menos 100 veces menor, más preferiblemente una afinidad al menos 1000 veces menor en comparación con la afinidad por L1. La afinidad del anticuerpo por las diferentes proteínas puede determinarse, por ejemplo, midiendo la afinidad de unión a proteínas recombinantes, tal como se describe en el ejemplo 6. La unión del anticuerpo a los diferentes miembros de la familia de L1 de la familia de L1 también puede determinarse expresando dichas proteínas en células CHO y midiendo la unión del anticuerpo mediante análisis de FACS, tal como se describe en el ejemplo 1.2 y el ejemplo 7.

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

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

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

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

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

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

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

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a la molécula de unión de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad tumorogénica.

Además, la descripción también se refiere a un método para tratar una enfermedad tumorogénica, en el que un anticuerpo o molécula de unión se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad.

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

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

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

- En el contexto de la presente invención, el término "sensibilizar" debe entenderse como que tras el tratamiento con la molécula de unión de la invención, las células tumorales son más sensibles al tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia que antes de dicho tratamiento. Esto puede someterse a prueba, por ejemplo, aislando células tumorales del paciente y sometiéndolas a prueba in vitro para observar si el tratamiento con dicha molécula de unión de la invención da como resultado una sensibilización de las células. Esta prueba puede realizarse tal como se describe en la referencia (Sebens Mürkoster et al., Oncogene. 26 de abril de 2007; 26(19):2759-68, Epub 6 de noviembre de 2006).
- En una realización preferida, las células, antes de la administración de la molécula de unión de la invención, no eran sensibles al tratamiento o sólo eran sensibles hasta un grado en que el tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia no daba como resultado el efecto terapéutico deseado.
- Preferiblemente, con la ayuda de la molécula de unión de la invención, se aumenta la sensibilidad en al menos el 20%, más preferiblemente en al menos el 40% e incluso más preferiblemente en al menos el 100%.
- En Remingtons Pharmaceutical Sciences, 5ª ed., capítulo 33, en particular las páginas 624 a 652, por ejemplo, se facilita un resumen de fármacos quimioterapéuticos y radioterapia.
- Puede usarse cualquiera de los numerosos fármacos quimioterapéuticos en los usos de la invención. Estos compuestos se encuentran dentro de diversas categorías diferentes, incluyendo, por ejemplo, agentes alquilantes, antibióticos antineoplásicos, antimetabolitos y derivados de una fuente natural.
- Los ejemplos de agentes alquilantes que pueden usarse en la invención incluyen busulfano, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida (es decir, Cytoxan), dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, melfalán, procarbazona, estreptozocina y tiotepa.
- Los ejemplos de antibióticos antineoplásicos incluyen bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitomicina (por ejemplo, mitomicina C), mitoxantrona, pentostatina y plicamicina.
- Los ejemplos de antimetabolitos incluyen fluorodesoxiuridina, cladribina, citarabina, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5FU)), gemcitabina, hidroxiurea, mercaptopurina, metotrexato y tioguanina.
- Los ejemplos de derivados de una fuente natural incluyen docetaxel, etopósido, irinotecán, taxanos (por ejemplo, paclitaxel), tenipósido, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, prednisona y tamoxifeno.
- Ejemplos adicionales de agentes quimioterapéuticos que pueden usarse en la invención incluyen asparaginasa y mitotano.
- Además, también puede usarse ceramida C2.
- En una realización especialmente preferida, el fármaco quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en actinomicina D, mitomicina C, cisplatino, doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina, 5-FU, taxanos tales como paclitaxel y carboplatino.
- Según la invención, el término "radioterapia" se refiere a cada terapia con radiación que se usa comúnmente para tratar células tumorales. En una realización preferida, esta terapia incluye rayos γ , rayos X, microondas, radiación UV así como la administración directa de radioisótopos a células tumorales o cerca de éstas (braquiterapia).
- Tal como se mencionó anteriormente, el objetivo de este aspecto de la invención es sensibilizar células tumorales para el tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia. Por consiguiente, en una realización preferida, tras la sensibilización con la molécula de unión de la invención, al paciente se le trata adicionalmente con dicho fármaco quimioterapéutico o con dicha radioterapia.
- En el contexto de la presente invención, se prevé sensibilizar células tumorales de cualquier tipo celular o tratar cualquier enfermedad tumorogénica. Preferiblemente, las células tumorales o la enfermedad tumorogénica son de un tipo seleccionado del grupo que consiste en astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma, meduloblastoma, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer endometrial, cáncer renal, neuroblastomas, carcinomas de células escamosas, meduloblastomas, hepatoma, cáncer de colon y mesotelioma y carcinoma epidermoide.
- Además, se prefiere que las células tumorales sean de un tumor epitelial o la enfermedad tumorogénica sea un tumor epitelial, preferiblemente en el que el tumor epitelial es cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovarios o cáncer endometrial.
- En una descripción, el anticuerpo no induce efectos secundarios neuronales cuando se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Tal como se mencionó anteriormente, la molécula de unión se usa para la preparación de una composición farmacéutica.

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

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

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

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

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar un producto terapéutico de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas y microcápsulas: uso de células recombinantes que pueden expresar el producto terapéutico, uso de endocitosis mediada por receptor (por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432); construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión, mediante inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e

- intestinal, etc.), y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente de aerosolización.
- En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente a la zona que necesita el tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante una cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas tras la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un Implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un tumor maligno o tejido neoplásico o preneoplásico.
- En otra realización, el producto terapéutico puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990, Science 249:1527-1533), más particular un liposoma catiónico (documento WO 98/40052).
- En aún otra realización, el producto terapéutico puede administrarse mediante un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (Langer, citado anteriormente). En aún otra realización, un sistema de liberación controlada puede colocarse cerca de la diana terapéutica, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica.
- También se da a conocer un método para sensibilizar células tumorales en un paciente para el tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-L1 o molécula de unión. Todas las realizaciones descritas anteriormente también se aplican a este método.
- A lo largo de toda la invención, la expresión "cantidad eficaz" significa que una molécula o compuesto dados se administran en una cantidad suficiente para obtener un efecto terapéutico deseado. En el caso en el que, a lo largo de toda la Invención, se administren dos compuestos en una cantidad eficaz terapéutica, esto incluye que uno o cada uno de los compuestos se administre en una cantidad inferior a la terapéutica, es decir que la cantidad de cada compuesto por sí misma no sea suficiente para proporcionar un efecto terapéutico, pero que la combinación de los compuestos dé como resultado el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, también se incluye dentro de la presente invención que cada uno de los compuestos por sí mismo se administre en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- En otro aspecto de la invención, la invención se refiere a la molécula de unión de la invención para su uso en un método de tratamiento de células tumorales en un paciente tratado anteriormente con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
- Tal como se mencionó anteriormente, el tratamiento de células tumorales con anticuerpos anti-L1 ya se ha descrito en los documentos WO 02/04952 y WO 06/013051.
- En el contexto de la presente invención, la expresión "tratado anteriormente" puede incluir pacientes que ya se han tratado con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia en el transcurso de un régimen separado que ha tenido lugar, por ejemplo, en el plazo de los últimos seis u ocho meses.
- En el transcurso del tratamiento anti-tumoral con fármacos quimioterapéuticos o radioterapia, en la mayoría de los casos se observa que, tras una respuesta inicial del tumor a tal terapia (reducción de la masa tumoral o estabilización de la enfermedad), los tumores comienzan a progresar de nuevo. Habitualmente, tal progresión comienza semanas o meses tras tal terapia. Normalmente estos tumores son entonces resistentes a tratamientos adicionales con el fármaco quimioterapéutico aplicado anteriormente y se desean otras modalidades de tratamiento.
- Tal como se describió anteriormente, se ha encontrado que tales tumores resistentes expresan L1 y, por tanto, se convierten en una diana para anticuerpos anti-L1.
- Por tanto, según esta realización de la invención, la expresión "tratado anteriormente" significa preferiblemente que el paciente recibió anteriormente tal tratamiento, tal tratamiento mostró un efecto inicial y, en el momento de la terapia con el anticuerpo anti-L1 o la molécula de unión, el tumor está progresando de nuevo.
- Además, la expresión "tratado anteriormente" también puede observarse en un contexto en el que el anticuerpo L1 anti-L1 o la molécula de unión y el fármaco quimioterapéutico o la radioterapia se usan dentro del mismo régimen, lo que significa que los tratamientos se administran dentro de un calendario de tratamiento. En este contexto "en un calendario de tratamiento" significa que los tratamientos se aplican al mismo tiempo, uno tras otro o de manera intermitente, pero, al contrario que lo anterior, las distancias en el tiempo entre los tratamientos individuales son cortas (en el plazo de una semana o en el plazo de 2-4 días) y, si se observa éxito en un tratamiento, no se espera a la progresión tumoral antes de aplicarse el siguiente tratamiento.

- Preferiblemente, en este contexto, la invención incluye el caso en el que se trata a un paciente con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia y posteriormente, de manera preferible en el plazo de una semana o menos y más preferiblemente en el plazo de 2-4 días, se comienza un tratamiento con la molécula de unión de la invención. En una realización adicionalmente preferida, se llevan a cabo varios ciclos de quimioterapia o radioterapia por un lado y tratamiento con el anticuerpo anti-L1 o la molécula de unión, con intervalos preferiblemente de una semana o menos y más preferiblemente en el plazo de 2-4 días.
- En una realización preferida, el paciente es, al menos, parcialmente resistente al tratamiento con dicho fármaco quimioterapéutico o con radioterapia, un efecto observado a menudo en el transcurso de dichos tipos de tratamiento (véase anteriormente).
- En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de unión de la invención para su uso en un método de tratamiento de células tumorales en un paciente al menos parcialmente resistente a un tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia dados.
- En el contexto de la presente invención, la expresión "resistente al tratamiento" significa que la célula tumoral respectiva no reacciona al tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia de manera completa. En vez de eso, con respecto a estas células tumorales, el tratamiento con dicho fármaco quimioterapéutico o radioterapia es más bien ineficaz o incluso no muestra efectos.
- En un aspecto adicional de la invención, la invención se refiere a la molécula de unión de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad tumorigénica, en el que la molécula de unión se administra en combinación con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia, preferiblemente en el que el fármaco quimioterapéutico o la radioterapia se administran antes que la molécula de unión de la invención.
- Según la invención, la expresión "tratamiento de enfermedad tumorigénica" incluye tanto la destrucción de células tumorales, la reducción de la proliferación de células tumorales (por ejemplo en al menos el 30%, al menos el 50% o al menos el 90%) así como la inhibición completa de la proliferación de células tumorales. Además, esta expresión incluye la prevención de una enfermedad tumorigénica, por ejemplo, destruyendo células que pueden o son propensas a convertirse en células tumorales en el futuro así como la formación de metástasis.
- Según la invención, la expresión "en combinación con" incluye cualquier administración combinada de la molécula de unión y el fármaco quimioterapéutico o la radioterapia. Esto puede incluir la aplicación simultánea de los fármacos o la radioterapia o, preferiblemente, una administración separada. En el caso en el que se prevé una administración separada, preferiblemente se garantizará que no transcurrirá un periodo de tiempo significativo entre el momento de administración, de manera que la molécula de unión y el fármaco quimioterapéutico o la radioterapia todavía podrán ejercer un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. En tales casos, se prefiere que se ponga en contacto la célula con ambos agentes en el plazo de aproximadamente una semana, preferiblemente en el plazo de aproximadamente 4 días, más preferiblemente en el plazo de aproximadamente 12-36 horas entre sí.
- El fundamento tras este aspecto de la invención es que la administración de fármacos quimioterapéuticos o el tratamiento con radioterapia conducen a un aumento de la expresión de L1 sobre la superficie de las células tumorales que a su vez hace que las células tumorales sean una mejor diana para la molécula de unión.
- Por tanto, este aspecto de la invención también abarca regímenes de tratamiento en los que se administra la molécula de unión en combinación con el fármaco quimioterapéutico o la radioterapia en diversos ciclos de tratamiento en los que cada ciclo puede estar separado por un periodo de tiempo sin tratamiento que puede durar, por ejemplo, dos semanas y en los que cada ciclo puede implicar la administración repetida de la molécula de unión y/o el fármaco quimioterapéutico o la radioterapia. Por ejemplo, tal ciclo de tratamiento puede abarcar el tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia, seguido, por ejemplo, por aplicar dos veces la molécula de unión en el plazo 2 días.
- A lo largo de toda la invención, el experto entenderá que la terapia individual que va a aplicarse dependerá, por ejemplo, de las condiciones físicas del paciente o de la gravedad de la enfermedad y, por tanto, tendrá que ajustarse en cada caso.
- Especialmente en el transcurso de tales ciclos de tratamiento repetidos, también se prevé dentro de la presente invención que la molécula de unión se administre antes que el fármaco quimioterapéutico o la radioterapia.
- También se da a conocer un método para tratar células tumorales en un paciente tratado anteriormente con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-L1 o la molécula de unión. Además, la descripción se refiere a un método para tratar células tumorales en un paciente, al menos, parcialmente resistente al tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia dados, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti- L1 o molécula de unión. Además, la descripción se refiere a un método para tratar células tumorales en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-L1 o la molécula de unión en combinación con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia. Además, la descripción

se refiere a un método para tratar células tumorales en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-L1 o la molécula de unión.

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

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

La invención también se refiere a la molécula de unión de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad tumorigénica o para la sensibilización de células tumorales en un paciente para el tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.

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

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

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

15 **Leyendas para las figuras y las tablas**

Figura 1

- 20 (A) Análisis de FACS de células CHO, CHO-L1, SKOV3ip y OVMz. Se tiñeron las células con los mAb indicados (10 µg/ml) durante 30 min a 4°C. Seguido por un mAb conjugado con PE secundario. (B) Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se transfirieron lisados celulares de células CHO wt, CHO-L1, OVMz y SKOV3ip sobre una membrana de PVDF y entonces se incubaron con el mAb indicado frente a L1 (1 µg/ml), seguido por un mAb secundario conjugado con POX.

Figura 2

- 25 (A) Efecto de anticuerpos sobre la fosforilación de Erk en células SKOV3ip. Se incubaron las células durante 24 h a 37°C con los anticuerpos purificados indicados frente a L1 (10 µg/ml) o IgG1 de control de isotipo. También se trataron las células con DMSO (vehículo), o el inhibidor específico de MEK, PD59098. Se examinaron los lisados celulares para determinar la fosforilación de Erk. (B) Efecto de anticuerpos sobre la fosforilación de Erk en células SKOV3ip. Tinción fluorescente de células tratadas con anticuerpo con un anticuerpo específico de fosfo-Erk y un mAb secundario conjugado con Alexa488.

Figura 3

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

Figura 4

- 35 Expresión génica diferencial en células SKOV3ip. (A) Se transfectaron células SKOV3ip con ARNip específico de L1 o desorganizado y 72 h después se aislaron ARNm, se transcribieron para dar ADNc y se usaron como molde para qPCR (análisis de SYBRgreen). (B) Se trataron células SKOV3ip con el mAb L1-9.3 (10 µg/ml) o el mAb de control, IgG1 (10 µg/ml) y 96 h después se aislaron ARNm, se transcribieron para dar ADNc y se analizaron mediante qPCR para determinar la expresión de los genes indicados (análisis de SYBRgreen). (C) Expresión génica diferencial de células tumorales residuales. Se aislaron ARNm de tumores residuales a partir de animales tratados con anticuerpo, se transcribieron para dar ADNc y se analizaron mediante qPCR para determinar la expresión de los genes indicados.
- 40

Figura 5

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

Figura 6

- 50 (A) Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de constructos L1-V5. Se recibieron sobrenadantes de células de insecto Sf9 transfectadas de Ricardo Gouveia y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando mAb L1-9.3 y volvieron a analizarse con sonda mediante mAb anti-V5. (B) Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de constructos L1-FC. Se transfectaron constructos L1-FC en células Cos-7

usando reactivo de transfección Jet PEI®, tal como se describe. Tras 3 días, se purificaron los sobrenadantes usando SepharoseA y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando mAb L1-9.3.

Figura 7

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

Figura 8

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

Figura 9

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

Figura 10

15 Secuencias de ADN y de aminoácidos de las partes expresadas de constructos de scFv de L1_9.3 (a), L1-9.3Hu (b) y L1_9.3Hu3 (c).

Figura 11

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

Figura 12

Secuencias genómicas de los dominios variables del anticuerpo monoclonal 9.3.

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

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

Figura 13

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

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

Figura 14

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

Figura 15

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

Figura 16

45 L1-9.3 no se vio afectado por la desglicosilación de L1. Se muestra la tinción de inmunotransferencia de tipo Western de L1 en lisado celular no tratado y desglicosilado usando varios mAb anti-L1 diferentes. Los anticuerpos sometidos a prueba pueden dividirse en tres clases con respecto a su dependencia de la glicosilación: primera clase

(no afectada por la glicosilación): L1-9.3. Segunda clase (la unión en WB se vio afectada de manera negativa por la desglucosilación): 11A, 14.10, OV52.24 y OV549.20. Tercera clase (la unión en WB se vio afectada de manera positiva por la desglucosilación): 35.9 y 38.12.

Figura 17

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

Figura 18

Análisis de FACS de mAb L1-9.3 humanizados

15 Análisis de citometría de flujo de células SKOV3ip con pcDNA3.1-luciferasa. Se tiñeron las células con los mAb humanizados indicados (10 µg/ml) durante 30 min, 4°C, seguido por un mAb conjugado con PE secundario.

Figura 19

Modelo de xenoinjerto de SKOV3ip de ratón

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

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

Figura 20

Masa tumoral total in vivo

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

Figura 21

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

Figura 22

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

Tabla 1

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

45 EJEMPLOS

1. Ejemplo 1

1.1 Resumen del ejemplo 1

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

1.2 Resultados del ejemplo 1

1.2.1 Análisis de FACS de los nuevos anticuerpos contra L1

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

1.2.2 La fosforilación de Erk disminuye tras el tratamiento con anticuerpos

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

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

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

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

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

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

1.2.5 Análisis de la tumorigenicidad en ratones desnudos

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

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

1.2.6 Estudio de Biacore de los nuevos anticuerpos contra L1

Este estudio lo realizó Avidex (Oxford) tal como se describe en el ejemplo 6. La tabla 1 resume estos resultados referentes a la cinética de unión de los nuevos anticuerpos contra L1 (ka, kd y KD).

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

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

1.2.8 mAb L1-9.3 bloquea la unión homófila L1-L1

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

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Líneas celulares y cultivo celular

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

1.3.2 Anticuerpos

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

1.3.3 Análisis bioquímico

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

1.3.4 Análisis de FACS

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

1.3.5 Inmunofluorescencia

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

1.3.6 Ensayo de invasión

Se determinó la invasión de células tumorales in vitro en un ensayo de doble filtro tal como se describió anteriormente en Erkell et al. (1988). En resumen, se colocó una capa de Matrigel entre dos filtros, un filtro inferior de nitrocelulosa con poros de 5 μm y un filtro superior de policarbonato con poros de 8 μm . Tras la incubación de 10^5 células con la estructura intercalada de filtros durante 20 h en 1 ml de medio, se fijó la estructura intercalada y se separaron los filtros y se tiñeron con DAPI. Se contaron las células presentes en el gel en el filtro inferior, y se expresó la invasión celular como la razón del número de células en el filtro inferior con respecto al número total de células presentes en ambos filtros.

1.3.7 PCR cuantitativa

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

1.3.8 Ensayo de unión celular

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

1.3.9 Modelo tumoral y terapia

A ratones CD1 nu/nu atímicos hembra, libres de patógenos, (7-9 semanas de edad; 20 g de promedio; Charles River) se les inocularon 5×10^6 células de carcinoma de ovarios humanas marcadas con lacZ (SKOV3ip-lacZ) en la cavidad peritoneal en el día 0, conduciendo a una formación de tumor i.p. en el plazo de 5 semanas. Se diluyeron mAb anti-L1 en PBS estéril hasta la concentración necesaria para el tratamiento. Se trataron ratones portadores de tumor i.p. dos veces por semana con una disolución de 300 μl de la dosificación respectiva (10 mg/kg por aplicación, respectivamente), vehículo (PBS) o control de anticuerpo Hea125. Los tratamientos con anticuerpos comenzaron a partir del día 3 tras la inyección de células tumorales para dar a las células tumorales tiempo para fijarse al lado interno de la pared abdominal y las superficies de los órganos i.p. En la autopsia (día 38), se tomaron muestras de ascitis de todos los ratones y se determinó el volumen. Se extirparon todos los órganos i.p. (incluyendo la masa tumoral), la pared abdominal y el diafragma, se tiñeron con sustrato de β -galactosidasa (X-gal; Roche-Diagnostics, Penzberg, Alemania), se fotografiaron y se pesaron. Se extirpó la masa tumoral de color azul índigo entre los

órganos, en el diafragma y en el lado interno de la pared abdominal, y se pesó sola. Se calculó la carga tumoral relativa en cada ratón dividiendo el peso de la masa tumoral entre el peso de los sitios totales.

2. Ejemplo 2

Humanización del anticuerpo murino anti-L1 L1_9.3

- 5 Con el fin de humanizar el anticuerpo murino anti-L1 L1_9.3, se usaron los genes humanos ν - kappa 1 (humk1), y la familia de la cadena pesada variable III (humIII) como las secuenciasceptoras. El sistema de numeración usado en el presente documento para estos genes se adopta de Wu y Kabat (Kabat, E. A, Wu, T. T., Perry, HM, Gottesman, KS y Foeller, C (1992) Sequences of proteins of immunological interest, Diane Books Publishing company). Se alinearon las secuencias de aminoácidos de cadenas ligera y pesada del anticuerpo murino L1_9.3 frente a las
- 10 secuencias de aminoácidos de la cadena ligera humk1 y la cadena pesada humIII, respectivamente. Se generaron dos anticuerpos L1_9.3 humanizados (L1_9.3Hu y L1_9.3Hu3) sustituyendo las CDR correspondientes del anticuerpo murino L1_9.3 por las seis CDR del anticuerpo humano.

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

Bucle Esquema de numeración de Kabat

- 15 LCDR1 L24-L34
LCDR2 L50-L56
LCDR3 L89-L97
HCDR1 H31-H35B
HCDR2 H50-H65
20 HCDR3 H93-H101

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

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

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

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

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

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

3. Ejemplo 3

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

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

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

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

scFv Par de cebadores

L1_9.3 Yol811 y Yol812

L1-9.3Hu Yol813 y Yol814

L1_9.3Hu3 Yol813 y Yol814

5 A continuación se muestran las secuencias de cebadores.

Yol811 AGCCGGCCATGGCCGATATTCAGATGACCCAGAC

Yol812 TCTATGCAGCGGCCGCACCGCCGCTGCTCACGGTAACGCTG

Yol813 AGCCGGCCATGGCCGATATTCAGATGACCCAGAG

Yol814 TCTATGCAGCGGCCGCACCGCCGCTGCTCACGGTAACCAGGGTG

10 Se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,6% y se escindieron y purificaron las bandas de tamaño correcto. Se sometieron los productos de PCR a digestión doble con enzimas de restricción Nco1 y Not1 en condiciones convencionales seguido por nueva purificación. Se ligaron los productos de PCR en un vector de expresión periplasmática inducible por IPTG que contenía:

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

- sitios de clonación Nco1/Not1

- la región constante de cadena kappa de anticuerpo humano.

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

4. Ejemplo 4

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

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

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

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

5. Ejemplo 5

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

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

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

Se lavaron los pocillos tres veces con 370 µl de PBS y se bloquearon con leche en polvo al 3% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente.

Se mezclaron 50 µl de cada sobrenadante bacteriano durante la noche con 50 µl de leche en polvo al 6% en PBS durante 1 hora.

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

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

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

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

6. Ejemplo 6

20 Determinación de la afinidad de unión

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

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

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

30 Tabla 2

Anticuerpo	L1-9.3	L1-hu3
Ka [1/Ms]	2,6 x 10 ⁵	8,0 x 10 ⁵
Kd [1/s]	2,2 x 10 ⁻⁵	6,5 x 10 ⁻⁵
KD [M]	8,5 x 10 ⁻¹¹	8,1 x 10 ⁻¹¹

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

7. Ejemplo 7

Unión de anticuerpo a PBMC y células cancerosas

40 Se obtuvieron PBMC mediante centrifugación por gradiente de densidad a partir de sangre completa con EDTA de donantes humanos sanos. Se recogieron células tumorales OVMZ cultivadas mediante tripsinación. Se sembraron 1 x 10⁵ células/pocillo (75 µl) en tubos de FACS. Se prepararon diluciones de mAb L1-9.3 en medio de cultivo con EDTA 10 mM y se añadieron 75 µl/pocillo de dilución de mAb contra L1, a células PBMC y OVMZ para dar como resultado concentraciones finales de entre 6,6x10⁻¹³ y 6,6x10⁻⁸ M. Posteriormente, se incubaron las células durante la noche (~24 h) a 37°C/CO₂ al 5% en una incubadora. Se lavaron las células directamente en tubos de FACS usando 2 ml de tampón de FACS seguido por centrifugación a 300 g/5 min/4°C. Se retiró el sobrenadante mediante pipeteado. Para la tinción, se añadió un anticuerpo secundario de burro marcado con PE anti-ratón (Dako) a un volumen de 150 µl/pocillo seguido por incubación durante 30 min a 4°C. Se repitieron etapas de lavado como anteriormente y se fijaron las células en 200 µl de PBS/formaldehído al 1%. Entonces se midió la fluorescencia media de la muestra mediante análisis de FACS.

50 Tal como se muestra en la figura 13, el mAb L1-9.3 presenta una afinidad fuertemente reducida por L1 en PBMC en comparación con L1 tumoral. Se detectó unión de L1-9.3 a PBMC en el intervalo nanomolar (línea discontinua),

mientras que pudo observarse unión a células tumorales a concentraciones picomolares (línea continua). B) Se estimaron las constantes de disociación K_d a partir de las curvas de regresión usando la concentración a la mitad de la unión máxima. K_D de L1-9.3 en CMSP fue al menos 400 veces inferior a aquella en células tumorales.

8. Ejemplo 8

5 Determinación de liberación de citocina

Se obtuvieron PBMC mediante centrifugación por gradiente de densidad a partir de sangre completa con citrato de donantes humanos sanos. Se resuspendieron las células en RPMI 1640/suero humano al 5%/5 ml de NEAA/5 ml de L-glutamina/5 ml de piruvato de sodio. Se sembraron 1×10^5 células por 100 μ l en placas de 96 pocillos de fondo redondo. En una segunda etapa, se añadieron 100 μ l de medio que contenía LPS (10 ng/ml), mAb L1-9.3 (20 μ g/ml), mAb OKT3 (Ebioscience) (75 ng/ml) o ionomicina/PMA (1 μ g/ml/5 ng/ml) por triplicado seguido por una incubación durante 24 h a 37°C, CO₂ al 5%. Como control negativo, se usaron PBMC sin tratar. Tras 24 h, se midieron los niveles del interferón-gamma de las citocinas y el factor de necrosis tumoral mediante análisis de FACS usando los conjuntos flexibles para citocinas CBA (BD) según la información del fabricante.

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

9. Ejemplo 9

Ensayo de proliferación de células T

Se obtuvieron PBMC mediante centrifugación por gradiente de densidad a partir de sangre completa con citrato de dos donantes humanos sanos. Se sembraron 1×10^5 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano. En una segunda etapa, se añadieron 100 μ l de medio que contenía o bien mAb L1-9.3 (20 μ g/ml) y OKT3 (Ebioscience, 75 ng/ml) o bien mAb L1-9.3 (20 μ g/ml) u OKT3 (75 ng/ml) por triplicado. Tras 1 h, los dos últimos se complementaron con OKT3 o L1-9.3, respectivamente. Para excluir cualquier activación relacionada con el anticuerpo, se incubaron PBMC con o sin L1-9.3 en ausencia de OKT3. Tras una incubación durante 24 h a 37°C, CO₂ al 5%, se evaluó la proliferación de células T usando un ensayo de incorporación de BrdU (Roche) según la información del fabricante.

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

10. Ejemplo 10

Dependencia de la glicosilación de la unión de anticuerpo

Se sembraron 2×10^6 células SKOV3ip en una placa de Petri de 10 cm y se incubaron durante 24 h a 37°C, CO₂ al 5%. Tras 24 h, se lavaron las células con PBS y se sometieron a lisis con 500 μ l de reactivo M-PER (Pierce) según el protocolo descrito en el kit de inmunoprecipitación de mamíferos clásico Seize (Pierce). Se desglicosilaron los lisados de células SkOv3ip tal como se describe en el kit Enzymatic CarboRelease (QA_Bio). En resumen, se añadieron 2,5 μ l de disolución de desnaturalización a 35 μ l de lisado celular. Se incubó la muestra en un termobloque a 100°C durante 5 min y después se enfrió en hielo. Finalmente se añadieron 2,5 μ l de Triton-X y 1 μ l de cada glicosidasa contenida en el kit Enzymatic CarboRelease (QA_Bio) (PGNasa F, O-glicosidasa, sialidasa, β -galactosidasa, glucoaminidasa) según el protocolo del fabricante seguido por una incubación a 37°C durante 3 h. Se sometieron productos glicosilados y desglicosilados a SDS PAGE y posterior inmunotransferencia de tipo Western. Se incubaron las inmunotransferencias de tipo Western con diferentes anticuerpos contra L1 dependiendo de su rendimiento de tinción. Se usaron concentraciones de 1 μ g/ml (9.3, 11A y 14.10), 5 μ g/ml (35.9) o 10 μ g/ml (OV52.24, OV543.18, 38.12, OV549.20). Se detectó la unión de anticuerpo contra L1 a la inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo marcado con HRP anti-ratón (Dianova).

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

11. Ejemplo 11

Biodistribución de L1-9.3 en conejo

A un conejo hembra (blanco del Himalaya) se le inyectó dos veces L1-9.3 (0 h, 24 h) mediante la vía de aplicación intravenosa a una dosis de 10 mg/kg. 1 animal de control recibió un volumen comparable de PBS. Se realizó la autopsia de los animales 72 h tras la primera aplicación. Se fijaron los órganos en formalina tamponada al 4% y se incrustaron en parafina. Se prepararon cortes histológicos y se realizó la inmunohistoquímica. Se tiñeron secciones tisulares del animal tratado con L1-9.3 y el control con un anticuerpo anti-ratón para detectar la unión de L1-9.3 tras la aplicación intravenosa. Se visualizaron señales mediante DAB (Sigma). Se usaron dos sistemas de detección

5 diferentes, método de complejo de avidina/biotina convencional o método de sistema de amplificación de señal por tiramida CSA II (Dako), que permitieron una estimación basta de la cantidad de L1-9.3 unido in vivo. El método de complejo de avidina/biotina convencional (Vector Laboratories) puede detectar concentraciones de L1-9.3 de 50 ng/ml o superiores, mientras que el sistema de amplificación de señal por tiramida libre de biotina CSA II (Dako) tiene un límite de detección de 5 ng/ml. Para determinar el patrón de expresión de L1, se incubaron tejidos del animal de control con anticuerpo L1-9.3 primario y con el anticuerpo de detección. Para el método de ABC se usó un anticuerpo anti-ratón biotinilado (Dianova, dilución de 1:3000) como anticuerpo de detección, el método de CSA se realizó según el protocolo del fabricante.

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

12. Ejemplo 12

Función de formas humanizadas de mAb L1 9.3 en ratones desnudos

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

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

13. Ejemplo 13

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

Tabla 1

mAb	FACS	Inmuno-transferencia de tipo Western	IP	L1-Fc	Invasión	fosfo-Erk	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Crecimiento tumoral
L1-9.3	+++	+++	+++	+++	-60%	-50%	2,6E+05	2,2E-05	8,5E-11	-60%
L1-11A	+++	+++	+++	+++	-50%	-40%	1,0E+05	4,0E-06	4,0E-11	-40%
L1-14.10	+	++	+	+++	-40%	-40%	1,4E+04	1,0E-06	7,1E-11	-30%
L1-38.12	+	+++	+	+++	0	0	3,7E+04	2,0E-06	5,4E-11	

mAb	FACS	Inmuno- transferencia de tipo Western	IP	L1-Fc	Invasión	fosfo- Erk	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Creci- miento tumoral
L1-35.9	+	+++	+	+++	0	0	4,0E+04	1,2E-05	3,0E-10	
L1- N15.17	++	-	++	++	0	0	5,3E+04	1,0E-03	1,9E-08	
L1- 1D12.22	-	-	+	++	0	-20%	2,3E+04	1,0E-04	4,3E-09	
L1- 1D17.3	-	-	+	++	0	0	2,3E+04	1,0E-04	4,3E-09	
L1- 1D64.8	-	+++	+	+++	0	0	8,5E+04	1,5E-04	1,8E-09	
L1- 1D74.8	-	+++	+	+++	-10%	0	3,0E+04	2,0E-03	6,7E-08	

Se describe lo siguiente:

1. Un anticuerpo monoclonal anti-L1 que puede unirse al mismo epítipo de L1 reconocido por el anticuerpo monoclonal 9.3, producido por la célula de hibridoma depositada como DSMZ ACC2841.
- 5 2. El anticuerpo monoclonal anti-L1 según el punto 1, en el que el epítipo está dentro del primer dominio similar a inmunoglobulina de L1.
3. Un anticuerpo monoclonal anti-L1, que tiene la misma capacidad para inhibir el crecimiento tumoral que el anticuerpo monoclonal 9.3, producido por la célula de hibridoma depositada bajo DSMZ ACC2841.
- 10 4. Un anticuerpo monoclonal anti-L1, caracterizado porque al menos una de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR):
 - a) tiene una de las siguientes secuencias RASQDISNYLN, YTSRLHS, QQGNTLPWT, RYWML, EINPRNDRNTNYNEKFKT o GGGYAMDY o
 - b) tiene una secuencia que, en comparación con las secuencias mencionadas en a) tiene al menos un intercambio de aminoácidos conservador.
- 15 5. Un anticuerpo monoclonal, producido por la célula de hibridoma depositada bajo DSMZ ACC2841.
6. Un anticuerpo humanizado basado en el anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos 1 a 5.
7. El anticuerpo humanizado del punto 6, que tiene al menos un residuo de CDR no humana y región de marco humano (FR).
- 20 8. El anticuerpo humanizado según cualquiera de los puntos 6 ó 7, que comprende la secuencia de L1_9.3hu o L1_9.3hu3, como se muestra en la figura 8 a) y b).
9. Una molécula de unión que comprende
 - a) al menos una de las siguientes secuencias RASQDISNYLN, YTSRLHS, QQGNTLPWT, RYWML, EINPRNDRNTNYNEKFKT o GGGYAMDY o
 - b) al menos una secuencia que tiene, en comparación con las secuencias dadas en a), al menos un intercambio de aminoácidos conservativo.
- 25 10. La molécula de unión del punto 9, que se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monocatenarios (por ejemplo scFv, multímeros de scFv como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab), Tandab, Flexibodies, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos quiméricos.
- 30 11. El anticuerpo de cualquiera de los puntos 1 a 8 o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 9 ó 10, unidas a una sustancia activa, preferiblemente una toxina, una citoquina, una nanopartícula o un radionucleótido.

12. Una célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos 1 a 5.
13. La célula de hibridoma depositada bajo DSMZ ACC2841.
14. El uso del anticuerpo o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 1 a 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad tumorogénica.
- 5 15. El uso del anticuerpo o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 1 a 11 para sensibilizar células tumorales en un paciente para el tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
16. El uso del punto 15, en el que las células son, al menos, parcialmente resistentes al tratamiento con dicho fármaco quimioterapéutico o a radioterapia.
- 10 17. El uso de cualquiera de los puntos 15 ó 16, en el que, después de la sensibilización con el anticuerpo anti-L1, el paciente se trata adicionalmente con dicho fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
18. El uso del anticuerpo o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 1 a 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad tumorogénica en un paciente previamente tratado con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
- 15 19. El uso del punto 18, en el que el paciente es, al menos, parcialmente resistente al tratamiento con dicho fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
20. El uso del anticuerpo o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 1 a 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad tumorogénica en un paciente, al menos, parcialmente resistente al tratamiento con un fármaco quimioterapéutico dado o con radioterapia.
- 20 21. El uso del anticuerpo o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 1 a 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad tumorogénica, en el que la molécula de unión de L1 se administra en combinación con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
22. El uso del punto 21, en el que el fármaco quimioterapéutico o la radioterapia se administra antes del anticuerpo anti-L1.
- 25 23. El uso de cualquiera de los puntos 14 a 22, en el que las células tumorales o la enfermedad tumorogénica son de un tipo seleccionado del grupo que consiste en astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma, meduloblastoma, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer renal, neuroblastomas, carcinomas escamosos, meduloblastomas, hepatoma, cáncer de colon y mesotelioma y carcinoma epidermoide.
- 30 24. El uso de cualquiera de los puntos 14 a 22, en el que las células tumorales son de un tumor epitelial o la enfermedad tumorogénica es un tumor epitelial, preferiblemente en el que el tumor epitelial es cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de ovario o cáncer de endometrio.
- 35 25. El uso de cualquiera de los puntos 15 a 24, en el que el fármaco quimioterapéutico es un agente que daña el ADN, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino, doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina, 5-FU, taxanos, preferiblemente paclitaxel y carboplatino.
26. El uso de cualquiera de los puntos 15 a 24, en el que la radioterapia se selecciona del grupo que consiste en radiación de rayos X, radiación UV, irradiación con radiación gamma, alfa o beta y microondas.
27. El anticuerpo o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 1 a 11 para su uso como medicamento.
- 40 28. El anticuerpo o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 1 a 11 para su uso como un medicamento para el tratamiento de una enfermedad tumorogénica o para sensibilizar células tumorales en un paciente para el tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
29. El anticuerpo o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 1 a 11 para su uso como un medicamento en el tratamiento de células tumorales, con las características definidas en cualquiera de los puntos 16 a 26.
- 45 30. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo o la molécula de unión de cualquiera de los puntos 1 a 11.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des Öffentlichen Rechts (DKFZ)
- <120> Tratamiento de tumores usando anticuerpos anti-L1 específicos
- 5 <130> D64791PCEPT1
- <160> 23
- 10 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
 <211> 108
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
- <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo L1_9.3 (Figura 8a)
- 20 <400> 1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Phe Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105
- <210> 2
 <211> 109
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos ligera anticuerpo humkappa1 (Figura 8a)
- 30 <400> 2
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ile Ser
 20 25 30

ES 2 658 342 T9

Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu
 85 90 95

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo REI (Figura 8a)

10

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ile Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
 100 105

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo L1_9.3Hu (Figura 8a)

20

<400> 4

ES 2 658 342 T9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 5

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo L1_9.3Hu3 (Figura 8a)

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 6

15 <211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo L1_9.3 (Figura 8b)

<400> 6

ES 2 658 342 T9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Asn Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Leu Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Asp Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 118
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo HumIII (Figura 8b)

<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Asp
20 25 30

Tyr Ala Met Ser Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ala Val Ile Ser Asn Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Ser Arg Phe Phe Asp Val Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 8
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 658 342 T9

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo 1_9.3hu (Figura 8b)

5 <400> 8
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Leu Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Asp Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 117

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo L1_9.3hu3 (Figura 8b)

15 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Leu Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Asn Pro Arg Asn Asp Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

ES 2 658 342 T9

<210> 10
 <211> 253
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

 <400> 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Phe Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Ser Gly Pro
 100 105 110
 Gly Asp Gly Gly Lys Gly Gly Pro Gly Lys Gly Pro Gly Gly Glu Gly
 115 120 125
 Thr Lys Gly Thr Gly Pro Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly
 130 135 140
 Ala Glu Leu Val Lys Ser Gly Ala Ser Val Asn Leu Ser Cys Arg Ala
 145 150 155 160
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met Leu Trp Val Arg Gln Arg
 165 170 175
 Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Asp
 180 185 190
 Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val
 195 200 205
 Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 210 215 220
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Met
 225 230 235 240
 10 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 11
 <211> 253
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de L1_9.3Hu scFv humanizada (Figura 9b)

ES 2 658 342 T9

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Ser Gly Pro
100 105 110

Gly Asp Gly Gly Lys Gly Gly Pro Gly Lys Gly Pro Gly Gly Glu Gly
115 120 125

Thr Lys Gly Thr Gly Pro Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Arg Ala
145 150 155 160

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met Leu Trp Val Arg Gln Arg
165 170 175

Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Asp
180 185 190

Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val
195 200 205

Asp Arg Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala
210 215 220

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Met
225 230 235 240

5 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 12

<211> 253

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de L1_9.3Hu3 scFv humanizada (Figura 9c)

15 <400> 12

ES 2 658 342 T9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Ser Gly Pro
 100 105 110

Gly Asp Gly Gly Lys Gly Gly Pro Gly Lys Gly Pro Gly Gly Glu Gly
 115 120 125

Thr Lys Gly Thr Gly Pro Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 130 135 140

Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Arg Ala
 145 150 155 160

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met Leu Trp Val Arg Gln Arg
 165 170 175

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Asn Pro Arg Asn Asp
 180 185 190

Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Thr Arg Phe Thr Ile Ser Val
 195 200 205

Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala
 210 215 220

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Met
 225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

5 <210> 13
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 13

ES 2 658 342 T9

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Phe Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

ES 2 658 342 T9

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
 100 105 110
 Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Ser Gly Pro Gly Asp Gly Gly Lys Gly Gly Pro Gly Lys
 130 135 140
 Gly Pro Gly Gly Glu Gly Thr Lys Gly Thr Gly Pro Gly Gly Gln Val
 145 150 155 160
 Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Ser Gly Ala Ser Val
 165 170 175
 Asn Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met
 180 185 190
 Leu Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu
 195 200 205
 Ile Asn Pro Arg Asn Asp Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Thr
 210 215 220
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 225 230 235 240
 Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu
 245 250 255
 Gly Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 260 265 270
 Val Ser Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 275 280 285
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 290 295 300
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 305 310 315 320
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 325 330 335

ES 2 658 342 T9

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 340 345 350

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 355 360 365

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser His
 370 375 380

His His His His His
 385

<210> 14
 <211> 1178
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 14
 acatatgaaa tacctattgc ctacggcagc cgctggattg ttattactcg cggcccagcc 60
 ggccatggcc gatattcaga tgacccagac cagcagcagc ctgagcgcgt ttctgggcga 120
 tcgtgtgacc attagctgcc gtgagagcca ggatattagc aactatctga actgggatca 180
 gcagaaaacc gatggcaccg tgaactgct gatttattat accagccgct tgcatagcgg 240
 tgtgccgagc cgttttagcg gcagcggtag cggcaccgat tatagcctga ccatttctaa 300
 cctggaacag gaagattttg cgacctattt ttgccagcag ggcaacacgc tgccgtggac 360
 ctttgccggt ggcaccaaac tggaaattaa acgtactagt ggtccgggcg atggcggtaa 420
 aggcggtccg ggcaaaggct cgggtggcga aggcaccaa ggcaactggc cgggggtca 480
 ggttcagctg cagcagccgg gtgcggaact ggtgaaaagc ggcgcgagcg tgaacctgag 540
 ctgtctgtcg agcggctata cttttaccgg ttattggatg ctgtgggtgc gtcagcgtcc 600
 gggccacggc ctggaatggg tgggcgaaat taatccgctg aacgatcgt ccaactataa 660
 cgaaaaattc aaaaccaaag cgaccctgac cgtggatcgt agcagcagca ccgctatat 720
 gcagctgacg agcctgacct ctgaagatag cgcggtgat ttctgcgcgc tgggcggtgg 780
 ctatgcgatg gattattggg gccagggcac cagcgttacc gtgagcagcg gcggtgcggc 840
 cgctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc 900
 ctctgtgtg tgctgtctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgggaagg 960
 ggataacgcc ctccaatcgg gtaactcca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga 1020
 cagcactac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa 1080
 agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagttcg cccgtcacia agagcttcaa 1140
 ccgcgagag tcacaccacc accaccacca ctagtaat 1178

10

<210> 15
 <211> 1178
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 15

ES 2 658 342 T9

tgtatacttt atggataacg gatgccgtcg gcgacctaac aataatgagc gccgggtcgg 60
 ccggtaccgg ctataagtct actgggtctg gtgctcgtcg gactcgcgca aagaccgct 120
 agcacactgg taatcgacgg cacgctcggg cctataatcg ttgatagact tgaccatagt 180
 cgtctttggc ctaccgtggc actttgacga ctaaataata tggtcggcag acgtatcgcc 240
 acacggctcg gcaaaatcgc cgctgccatc gccgtggcta atatcggact ggtaaagatt 300
 ggacctgtc cttctaaaac gctggataaa aacggctcgc ccgttggtcg acggcacctg 360
 gaaaccgcca ccgtgggttg acctttaatt tgcatgatca ccaggcccgc taccgccatt 420
 tccgccaggc ccgtttccag gccaccgct tccgtggttt ccgtgacctg ggcccccagt 480
 ccaagtcgac gtcgctcgcc cacgccttga ccacttttcg ccgctcgc acttggactc 540
 gacagcacgc tcgccgatat ggaaatgggc aataacctac gacaccacg cagtcgcagg 600
 cccggtgccg gaccttacc acccgcttta attaggcgca ttgctagcat ggttgatatt 660
 gctttttaag ttttggtttc gctgggactg gcacctagca tcgctcgtcg ggcgcatata 720
 cgctgactgc tcggactgga gacttctatc gcgccacata aagacgcgcg acccgccacc 780
 gatacgtac ctaataaccc cgggtcccgtg gtcgcaatgg cactcgtcgc cgccacgccg 840
 gcgacgtggt agacagaagt agaagggcgg tagactactc gtcaacttta gaccttgacg 900
 gagacaacac acggacgact tattgaagat agggctctc cggtttcatg tcacctcca 960
 cctattgagg gaggttagcc cattgagggt cctctcacag tgtctcgtcc tgtcgttctt 1020
 gtcgtggatg tcggagtcgt cgtgggactg cgactcgttt cgtctgatgc tctttgtgtt 1080
 tcagatgagg acgcttcagt gggtagtccc ggactcaagc gggcagtggt tctcgaagtt 1140
 ggcgcctctc agtgtggtgg tggtggtggt gatcatta 1178

<210> 16
 <211> 406
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de aminoácidos de la porción expresada del constructo L1_9.3Hu scFv
 (Figura 10b)

<400> 16
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

ES 2 658 342 T9

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Ser Gly Pro Gly Asp Gly Gly Lys Gly Gly Pro Gly Lys
130 135 140

Gly Pro Gly Gly Glu Gly Thr Lys Gly Thr Gly Pro Gly Gly Glu Val
145 150 155 160

Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly Ser Leu
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met
180 185 190

Leu Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu
195 200 205

Ile Asn Pro Arg Asn Asp Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Thr
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu
245 250 255

Gly Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Ala Val Tyr Phe Cys Ala
260 265 270

Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
275 280 285

Thr Val Ser Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
290 295 300

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
305 310 315 320

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
325 330 335

ES 2 658 342 T9

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 340 345 350

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 355 360 365

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 370 375 380

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser
 385 390 395 400

His His His His His His
 405

<210> 17
 <211> 1179
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de la porción expresada del constructo L1_9.3Hu (Figura 10b)

<400> 17
 acatatgaaa tacctattgc ctacggcagc cgctggattg ttattactcg cggcccagcc 60
 ggccatggcc gatattcaga tgaccagag cccgagcagc ctgagcgcga gcgtgggtga 120
 tcgtgtgacc attacctgcc gtgagagcca ggatattagc aactatctga actggtatca 180
 gcagaaaccg ggcaaagcgc cgaaactgct gatttattat accagccgtc tgcatagcgg 240
 tgtgccgagc cgttttagcg gcagcggtag cggcaccgat tataccttta ccattagcag 300
 cctgcagccg gaagattttg cgacctattt ttgccagcag ggcaacacgc tgccgtggac 360
 ctttggcggg ggaccaaac tggaaattaa acgtactagt ggtccgggcg atggcggtaa 420
 aggcggtccg ggcaaaggtc cgggtggcga aggcaccaa ggcaactggc ccgggggtga 480
 agttcagctg gtgcagagcg gcggtggtct ggttcagagc ggtggcagcc tgcgtctgag 540
 ctgtcgtgcy agcggctata ccttcaccgg ttattggatg ctgtgggtgc gtcagcgtcc 600
 gggccacggc ctggaatggg tgggcgaaat taatccgcgt aacgatcgta ccaactataa 660
 cgaaaaattt aaaaccgct tcaccattag cgtggatcgt agcaaaagca ccgctatct 720
 gcagatggat agcctgcgct cggaagatac cgcggtgtat ttttgcgcgc tgggcggtgg 780
 ctatgcgatg gattattggg gccagggcac cctggttacc gtgagcagcg gcggtgcggc 840
 cgctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc 900
 ctctgtgtg tgccgtctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaagg 960
 ggataacgcc ctccaatcgg gtaactcca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga 1020
 cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa 1080
 agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagttcg cccgtcacia agagcttcaa 1140
 ccgaggagag tcacaccacc accaccacca ctagtaatt 1179

<210> 18
 <211> 1179
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de la porción expresada del constructo L1_9.3Hu (Figura 10b)

ES 2 658 342 T9

<400> 18
 tgtatacttt atggataacg gatgccgtcg gcgacctaac aataatgagc gccgggtcgg 60
 ccggtaccgg ctataagtct actgggtctc gggctcgtcg gactcgcgct cgcaccact 120
 agcacactgg taatggacgg cacgctcggc cctataatcg ttgatagact tgaccatagt 180
 cgtctttggc ccgtttcgcg gctttgacga ctaaataata tggtcggcag acgtatcggc 240
 acacggctcg gcaaaatcgc cgctcgccatc gccgtggcta atatggaaat ggtaatcgtc 300
 ggacgtcggc cttctaaaac gctggataaa aacggctcgtc ccgttgtgcg acggcacctg 360
 gaaaccgcca ccgtggtttg acctttaatt tgcgatgatca ccaggcccgc taccgccatt 420
 tccgccaggc ccgtttccag gccaccgct tccgtggttt ccgtgaccgg ggccccact 480
 tcaagtcgac cacgtctcgc cgccaccaga ccaagtctcg ccaccgtcgg acgcagactc 540
 gacagcacgc tcgccgatat ggaagtgggc aataacctac gacaccacg cagtcgcagg 600
 cccggtgccg gaccttacc acccgcttta attaggcgca ttgctagcat ggttgatatt 660
 gctttttaa ttttgggcga agtggtaatc gcacctagca tcgttttctg ggcgcataga 720
 cgtctaccta tcggagcgac gccttctatg gcgccacata aaaacgcgcg acccgccacc 780
 gatacgctac ctaataacct cggtcccgtg ggaccaatgg cactcgtcgc cgccacgccg 840
 gcgacgtggt agacagaagt agaagggcgg tagactactc gtcaacttta gaccttgacg 900
 gagacaacac acggacgact tattgaagat agggctcttc cggtttcatg tcacctcca 960
 cctattgagg gaggttagcc cattgagggt cctctcacag tgtctcgtcc tgtcgttctt 1020
 gtcgtggatg tcggagtcgt cgtgggactg cgactcgttt cgtctgatgc tctttgtgtt 1080
 tcagatgcgg acgcttcagt gggtagtccc ggactcaagc gggcagtggt tctcgaagtt 1140
 ggcgcctctc agtgtggtgg tgggtggtgg gatcattaa 1179

5 <210> 19
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN de la porción expresada del constructo L1_9.3Hu3 scFv c
 (Figura 10c)

<400> 19
 15 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

ES 2 658 342 T9

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
 100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Ser Gly Pro Gly Asp Gly Gly Lys Gly Gly Pro Gly Lys
 130 135 140

Gly Pro Gly Gly Glu Gly Thr Lys Gly Thr Gly Pro Gly Gly Glu Val
 145 150 155 160

Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly Ser Leu
 165 170 175

Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met
 180 185 190

Leu Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu
 195 200 205

Ile Asn Pro Arg Asn Asp Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Thr
 210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 225 230 235 240

Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu
 245 250 255

Gly Gly Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 260 265 270

Val Ser Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 275 280 285

ES 2 658 342 T9

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 290 295 300

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 305 310 315 320

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 325 330 335

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 340 345 350

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 355 360 365

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser His
 370 375 380

His His His His His
 385

<210> 20
 <211> 1179
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Secuencia de ADN de la porción expresada del constructo L1_9.3Hu3 scFv (Figura 10c)

<400> 20
 acatatgaaa tacctattgc ctacggcagc cgctggattg ttattactcg cggcccagcc 60
 ggccatggcc gatattcaga tgacccagag cccgagcagc ctgagcgcga gcggtgggtga 120
 tcgtgtgacc attacctgcc gtgagagcca ggatattagc aactatctga actggtatca 180
 gcagaaaccg ggcaaagcgc cgaaactgct gatttattat accagccgtc tgcatagcgg 240
 tgtgccgagc cgttttagcg gcagcggtag cggcaccgat tataccctga ccattagcag 300
 cctgcagccg gaagattttg cgacctattt ttgccagcag ggcaacacgc tgccgtggac 360
 ctttggcggg ggaccaaac tggaaattaa acgtactagt ggtccgggcg atggcggtaa 420
 aggcggtccg ggcaaaggtc cgggtgagca aggcacaaa ggcaactggc cggggggtga 480
 agttcagctg gtgcagagcg gcggtggtct ggttcagagc ggtggcagcc tgcgtctgag 540
 ctgtcgtgcg agcggctata cttttaccgg ttattggatg ctgtgggtgc gtcagcgtcc 600
 gggtaaaggc ctggaatggg tggcggaat taatccgctg aacgatcgta ccaactataa 660
 cgaaaaattt aaaaccgct tcaccattag cgtggatcgt agcaaaaaca ccctgtatct 720
 gcagatggat agcctgcgtg cggaagatac gcggtgtat ttttgcgcg tgggcggtgg 780
 ctatgcgatg gattattggg gccagggcac cctggttacc gtgagcagcg gcggtgcggc 840
 cgctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc 900
 ctctgttgtg tgctgtctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaagg 960
 ggataacgcc ctccaatcgg gtaactcca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga 1020
 cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa 1080
 agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagttcg cccgtcacia agagcttcaa 1140
 15 ccgaggagag tcacaccacc accaccacca ctagtaatt 1179

ES 2 658 342 T9

<210> 21
 <211> 1179
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de la porción expresada del constructo L1_9.3Hu3 scFv (Figura 10c)

10

<400> 21
 tgtatacttt atggataacg gatgccgtcg gcgacctaac aataatgagc gccgggtcgg 60
 ccggtaccgg ctataagtct actgggtctc gggctcgtcg gactcgcgct cgcacccact 120
 agcacactgg taatggacgg cacgctcggc cctataatcg ttgatagact tgaccatagt 180
 cgtctttggc ccgtttcgcg gctttgacga ctaaataata tggtcggcag acgtatcggc 240
 acacggctcg gcaaaatcgc cgtcgcctatc gccgtggcta atatgggact ggtaatcgtc 300
 ggacgtcggc cttctaaaac gctggataaa aacggtcgtc ccgttgtgcg acggcacctg 360
 gaaaccgcca ccgtggtttg acctttaatt tgcatgatca ccaggcccgc taccgccatt 420
 tccgccaggc ccgtttcag gccaccgct tccgtggttt ccgtgaccgg ggccccact 480
 tcaagtcgac cacgtctcgc cgccaccaga ccaagtctcg ccaccgtcgg acgcagactc 540
 gacagcacgc tcgccgatat ggaaatgggc aataacctac gacaccacg cagtcgcagg 600
 cccatttccg gaccttacc accgccttta attaggcgca ttgctagcat ggttgatatt 660
 gctttttaa ttttgggcga agtggtaatc gcacctagca tcgttttgtt gggacataga 720
 cgtctaccta tcggacgcac gccttctatg gcgccacata aaaacgcgcy acccgccacc 780
 gatacgctac ctaataaccc cgggtcccgtg ggaccaatgg cactcgtcgc cgccacgccc 840
 gcgacgtggt agacagaagt agaagggcgg tagactactc gtcaacttta gaccttgacg 900
 gagacaacac acggacgact tattgaagat agggctctc cggtttcatg tcaccttcca 960
 cctattgagg gaggttagcc cattgagggt cctctcacag tgtctcgtcc tgctgttctt 1020
 gtcgtggatg tcggagtcgt cgtgggactg cgactcgttt cgtctgatgc tctttgtgtt 1080
 tcagatgagg acgcttcagt gggtagtccc ggactcaagc gggcagtggt tctcgaagtt 1140
 ggcgcctctc agtgtggtgg tgggtggtgt gatcattaa 1179

15

<210> 22
 <211> 713
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> Secuencia genómica de la región variable de cadena kappa (Figura 12a)

<400> 22

ES 2 658 342 T9

gaagagttag ccttgtagct gtgctcagcc ctaaatagtt cccaaaaatt tgcattgctct 60
 cacttcctat ctttgggtac tttttcatat accagtcaga ttgtgagcca ttgtaattga 120
 agtcaagact cagcctggac atgatgtcct ctgctcagtt ccttgggtctc ctgttgcctc 180
 gtcttcaagg taaaagttac tacaatggga attttgctgt tgcacagtga ttcttgttga 240
 ctggaatfff ggaggggtcc tttcttttcc tgcttaactc tgtgggtatt tattgtgtct 300
 ccactcctag gtaccagatg tgatatccag atgacacaga ctacatcctc cctgtctgcc 360
 tttctgggag acagagtcac catcagttgc agggcaagtc aggacattag caattattta 420
 aactggatc agcagaaacc agatggaact gttaaactcc ttatctatta cacatcaaga 480
 ttacactcag gaggccctc aaggttcagt ggcagtggtt ctggaacaga ttattctctc 540
 accattagca acctggagca agaagatfff gccacttact ttgccaaca gggtaatacg 600
 cttccgtgga cattcgggtg aggcaccaag ctggaatca aacgtaaata gaatccaaag 660
 tctctttctt ccgttgtcta tgtctgtggc ttctatgtct acaaatgatg tat 713

<210> 23
 <211> 839
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia genómica de la región variable de cadena pesada (Figura 12b)

10

<400> 23
 ttcagcatcc tgattcctga cccaggtgtc cttcttctc cagcaggagt aggtgctcat 60
 ctaatatgta tcctgctcat gaatatgcaa atcctctgaa tctacatggt aatgtaggt 120
 ttgtctatat cacacacaga aaaacatgag atcacagttc tctctacagt tactgaacac 180
 acaggacctc accatgggat ggagctatat catcctcttt ttggtagcaa cagctacagg 240
 taaggggctc acagtagaag gcttgaggtc tggccatata catgggtgac agtgacatcc 300
 actttgcctt tctttccaca gatgtccact cccaggtcca actgcagcag cctggggctg 360
 aactggtgaa gtctggggct tcagtgaacc tgcctgcag ggcttctggc tacacctta 420
 ccagatactg gatgctctgg gtgaggcaga ggcctggaca tggccttgag tgggttggag 480
 agattaatcc tcgcaacgat cgtactaatt acaatgagaa attcaagacc aaggccacac 540
 tgactgtaga ccgatcctcc agcacagcct acatgcaact caccagcctg acatctgagg 600
 actctgcggt ctatctctgt gccctggggg ggggctatgc tatggactat tggggcaag 660
 gaacctcagt caccgtctcc tcaggtaaga atggcctctc caggctttaa tttttaacct 720
 ttgttatgga gttttctgag cattgcagac taatcttga tatttgtccc tgagggagcc 780
 ggctgagaga agttgggaaa taaactgtct agggatctca gagcctttag gacagatta 839

15

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión capaz de unirse a L1,
- 5 (a) siendo seleccionada del grupo que consiste en anticuerpos monocatenarios, scFv, multímeros de scFv como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, fragmentos de anticuerpos, Fab, Tandabs, Flexibodies, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos quiméricos,
- y/o
- (b) que comprende al menos un dominio Ig,
- y en el que la molécula de unión capaz de unirse a L1:
- 10 (i) se caracteriza porque sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) tienen las siguientes secuencias: LCDR1: RASQDISNYLN (SEQ ID No.: 24), LCDR2: YTSRLHS (SEQ ID No.: 25), LCDR3: QQGNTLPWT (SEQ ID No.: 26), HCDR1: RYWML (SEQ ID No.: 27), HCDR2: EINPRNDRTNYNEKFKT (SEQ ID No.: 28) y HCDR3: GGGYAMDY (SEQ ID No.: 29),
- y cuya molécula de unión se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} M, o
- 15 (ii) se caracteriza porque sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) tienen las siguientes secuencias: LCDR1: QDISNY (SEQ ID No.: 30), LCDR2: YTS, LCDR3: QQGNTLPWT (SEQ ID No.: 31), HCDR1: GYTFTRYW (SEQ ID No.: 32), HCDR2: INPRNDRT (SEQ ID No.: 33), y HCDR3: ALGGGYAMDY (SEQ ID No.: 34),
- y cuya molécula de unión se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-10} M.
2. La molécula de unión capaz de unirse a L1 de la reivindicación 1, en la que la molécula de unión se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-11} M.
3. La molécula de unión capaz de unirse a L1 de la reivindicación 1 ó 2 unida a una sustancia activa, preferiblemente una toxina, una citocina, una nanopartícula o un radionucléido.
4. Una molécula de unión capaz de unirse a L1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad tumorigénica.
- 25 5. Una molécula de unión capaz de unirse a L1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en un método de sensibilización de células tumorales en un paciente para el tratamiento con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
6. La molécula de unión capaz de unirse a L1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que las células son, al menos, parcialmente resistentes al tratamiento con dicho fármaco quimioterapéutico o radioterapia.
- 30 7. La molécula de unión capaz de unirse a L1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, en la que, al alterar la sensibilización con la molécula de unión, el paciente se trata adicionalmente con dicho fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
8. La molécula de unión capaz de unirse a L1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en un paciente previamente tratado con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
- 35 9. La molécula de unión capaz de unirse a L1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el paciente es al menos parcialmente resistente al tratamiento con dicho fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
10. La molécula de unión capaz de unirse a L1,
- (i) para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en un paciente al menos parcialmente resistente al tratamiento con un fármaco quimioterapéutico dado o con radioterapia, o
- 40 (ii) para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la molécula de unión se administra en combinación con un fármaco quimioterapéutico o con radioterapia.
11. La molécula de unión capaz de unirse a L1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, punto (ii), en donde el fármaco quimioterapéutico o la radioterapia se administra antes de la molécula de unión.
- 45 12. La molécula de unión capaz de unirse a L1 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en la que las células tumorales o la enfermedad tumorigénica son de un tipo seleccionado del grupo que consiste en astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma, meduloblastoma, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de próstata, cáncer de cabeza y

cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer renal, neuroblastomas, carcinomas escamosos, hepatoma, cáncer de colon y mesotelioma y carcinoma epidermoide, o

en el que las células tumorales provienen de un tumor epitelial o la enfermedad tumorigénica es un tumor epitelial.

5 13. La molécula de unión capaz de unirse a L1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el tumor epitelial es cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de ovario o cáncer de endometrio.

10 14. La molécula de unión capaz de unirse a L1 para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en donde el fármaco quimioterapéutico es un agente que daña el ADN, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino, doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina, 5-FU, taxanos, preferiblemente paclitaxel y carboplatino, o

en el que la radioterapia se selecciona del grupo que consiste en radiación de rayos X, radiación UV, irradiación γ , o irradiación β y microondas.

15. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión capaz de unirse a L1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

15 16. El uso de una molécula de unión capaz de unirse a L1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para determinar el nivel de la proteína L1 en tejidos corporales o fluidos in vitro.

Figura 1

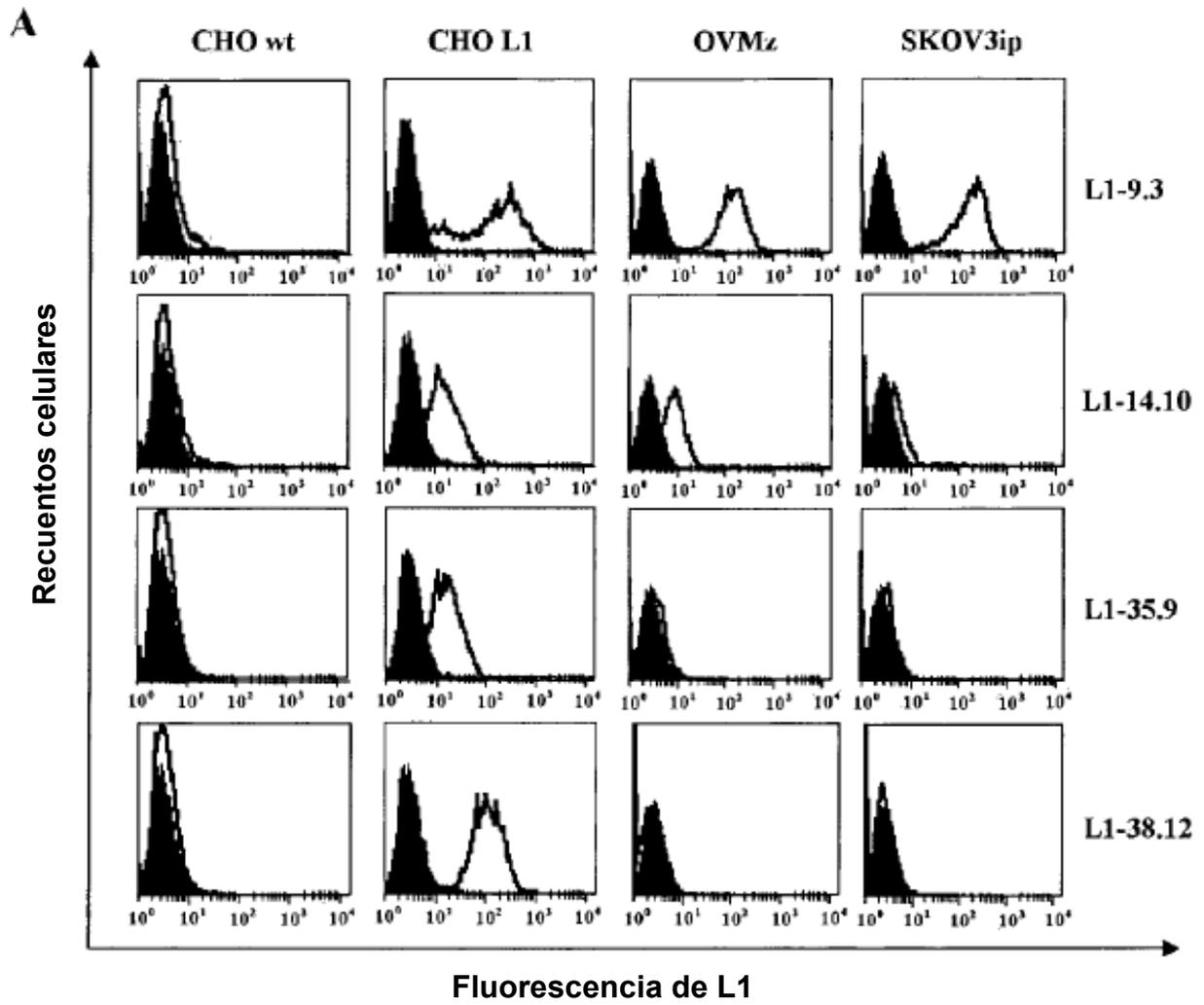


Figura 1

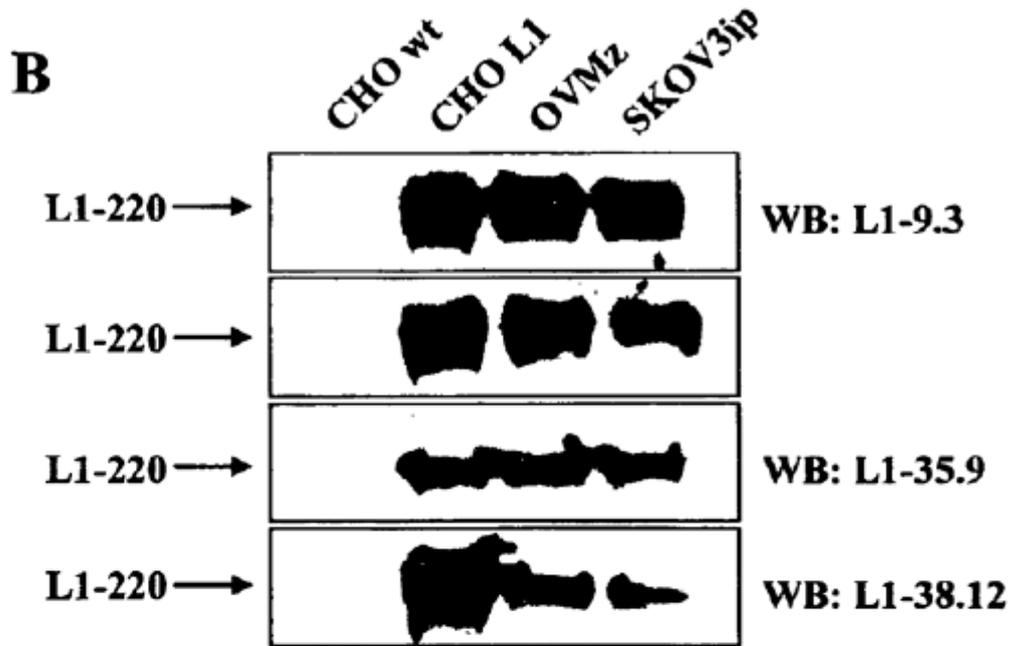
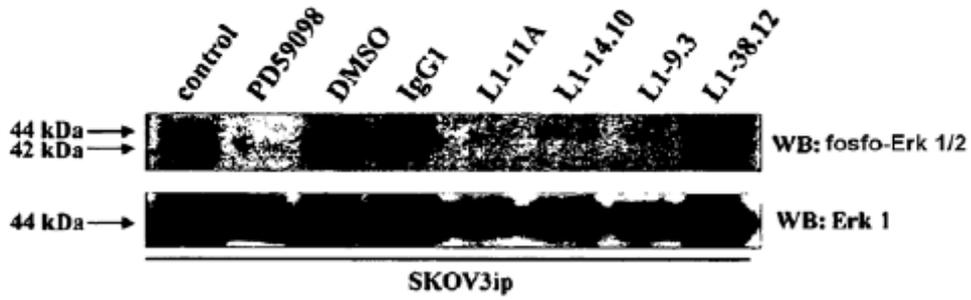


Figura 2

A



B

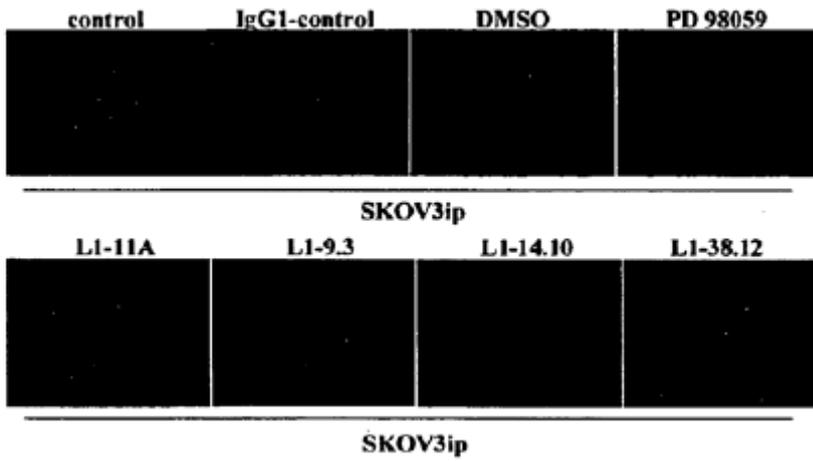


Figura 3

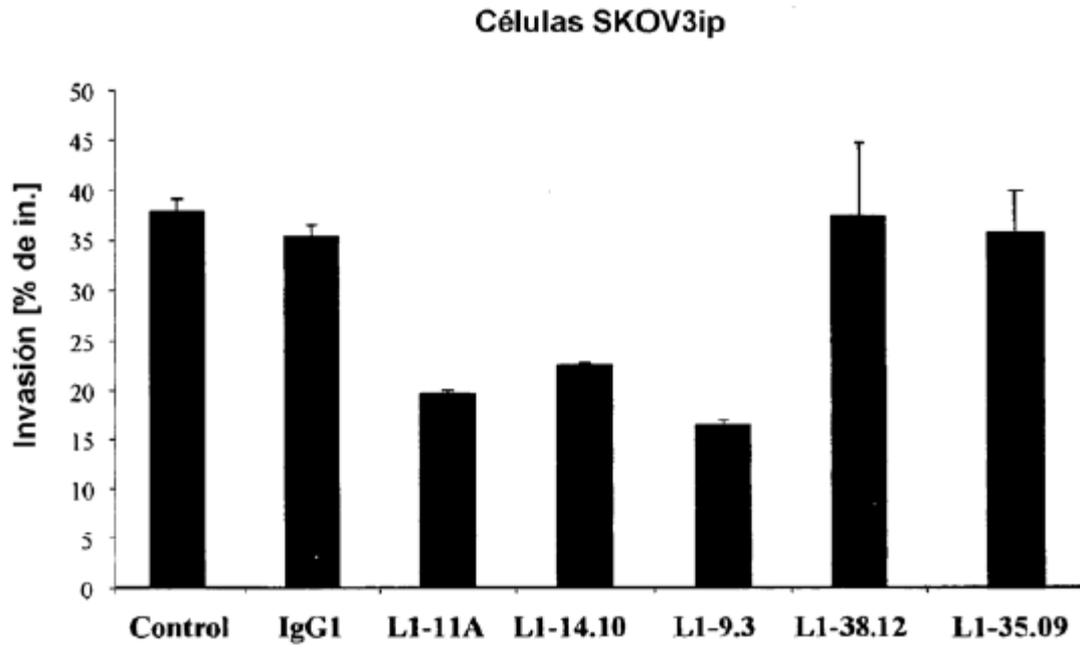
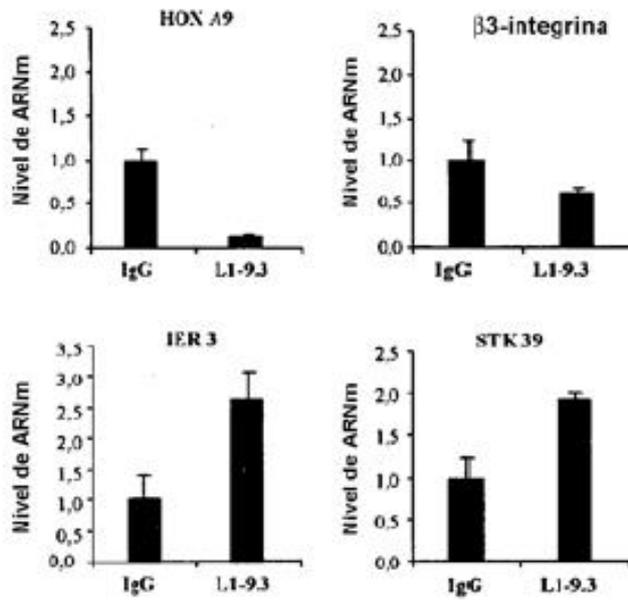


Figura 4

A

Células SKOV3ip + Acm



B

Células SKOV3ip + ARNip de L1

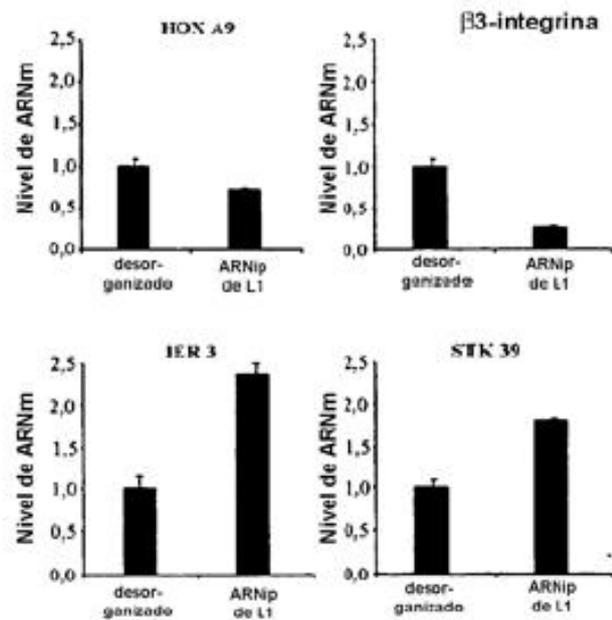
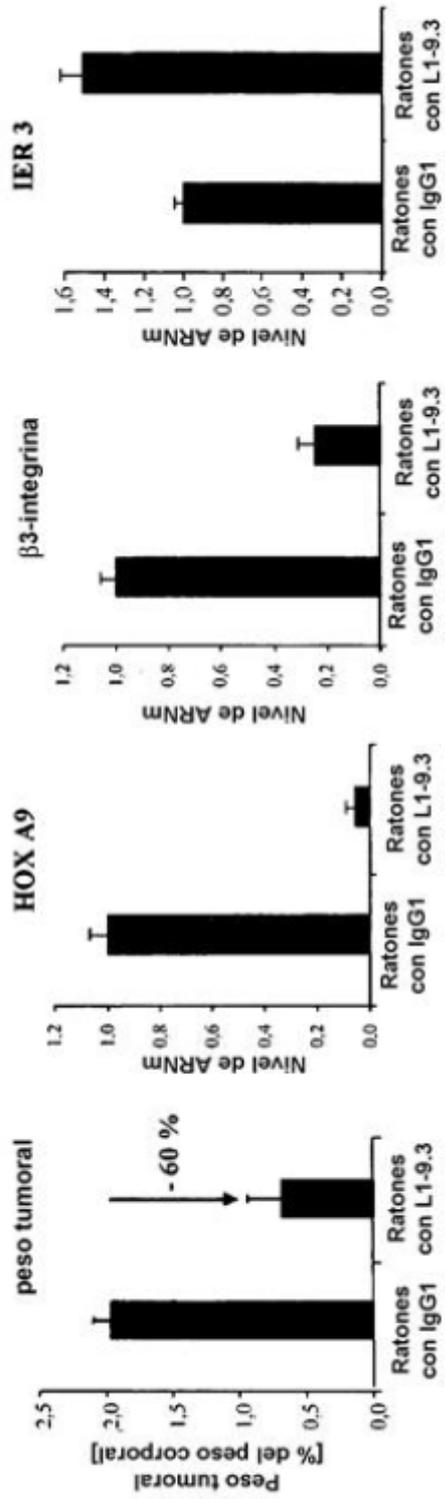


Figura 4



C

Figura 5

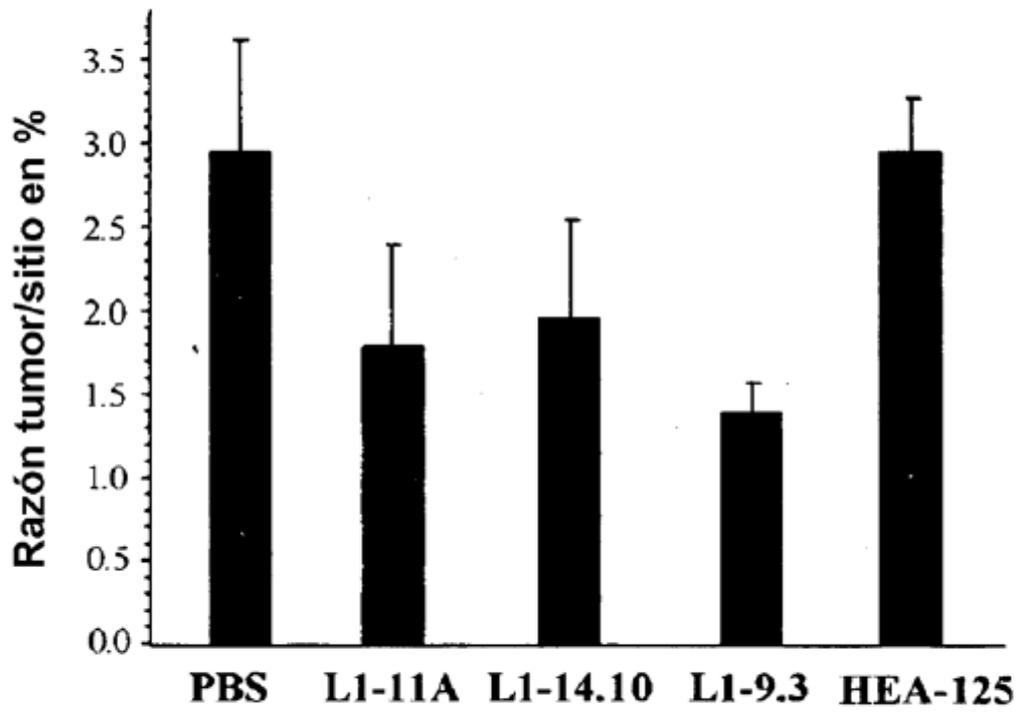


Figura 6

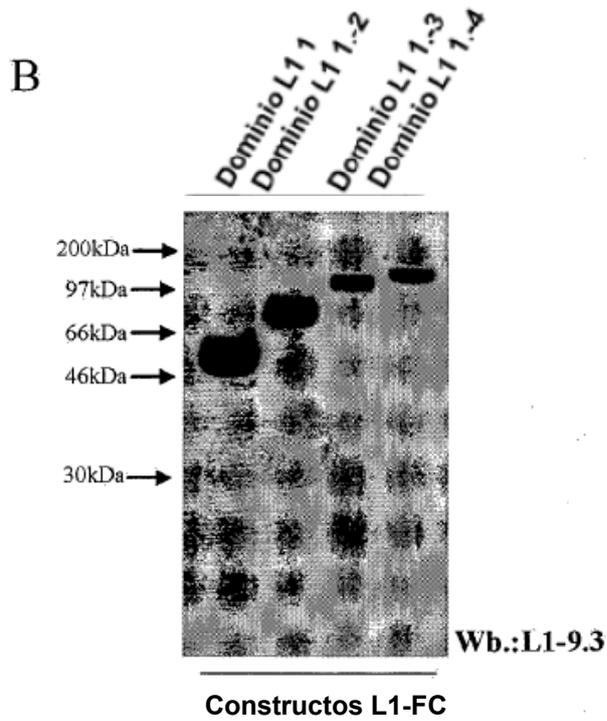
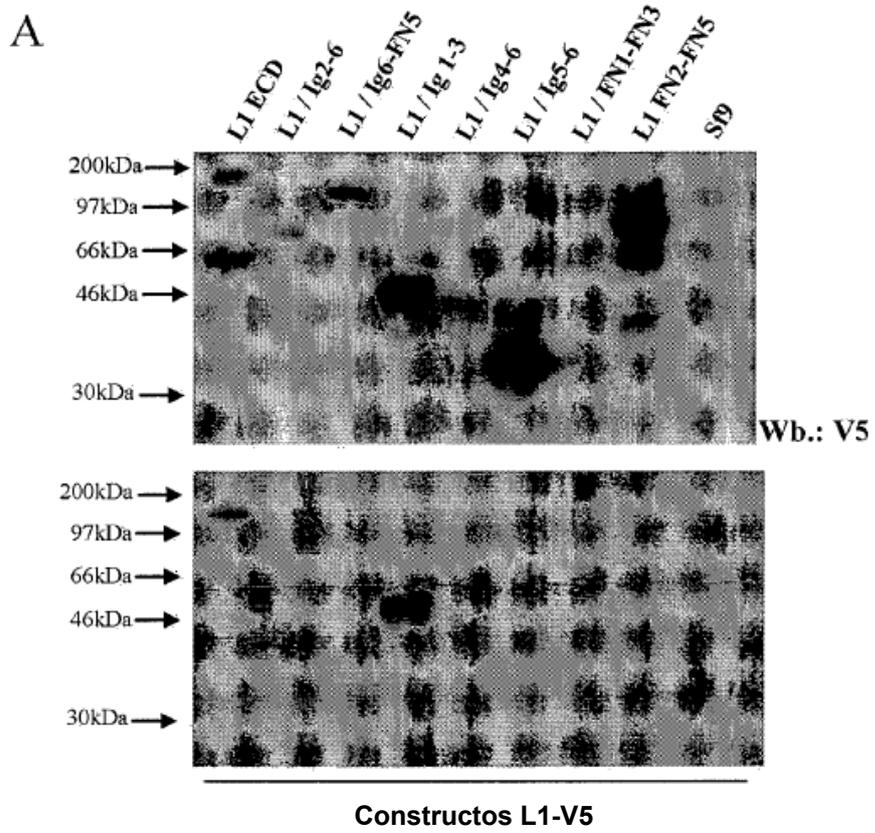
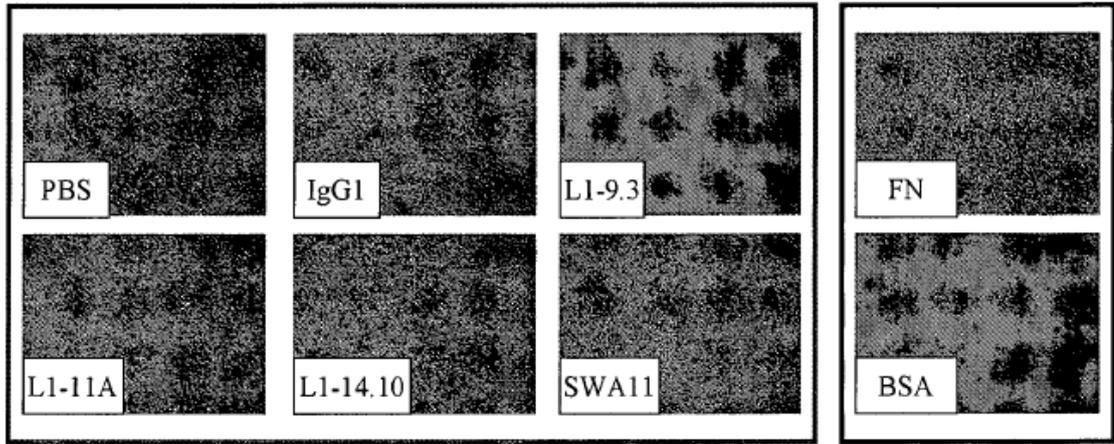


Figura 7

A



L1-Fc

B

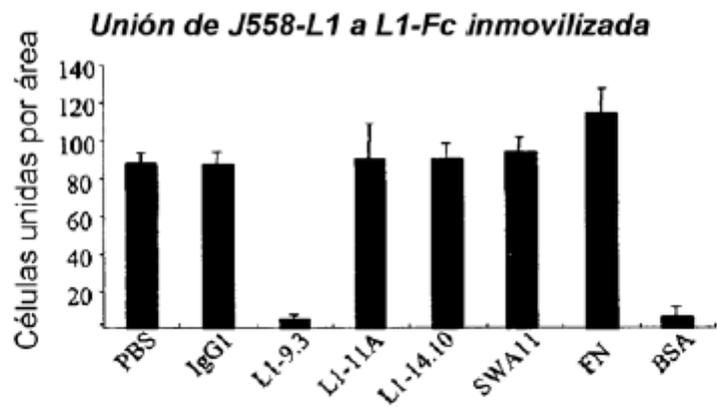


Figura 8

a) Secuencias de aminoácidos de cadena ligera de anticuerpo

nombre	CDR1			CDR2			CDR3				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1
L1_9_3	12345678901234567890123	45678901234567890123	DISHYLN	567890123456789	0123456	7890123456789012345678			9012345AUCDEF67	1	1
huak1	DIQKQTSLSLGAFLGRVTIIC	IASQ	DISHYLN	WIDQKFDCTYKLLIY	YTSRLRS	GVPSPFSGSGGCTDFSA7ISMLEDQDPATFIC			QGGKELP	0	1
REI	DIQKQTSLSLGAFLGRVTIIC	IASQ	DIIRYLN	WIDQKPKAKLLIY	AASLLES	GVPSPFSGSGGCTDFSA7ISMLEDQDPATFIC			QGGKELP	0	1
L1_9_3hu	DIQKQTSLSLGAFLGRVTIIC	IASQ	DISHYLN	WIDQKPKAKLLIY	EASNLQA	GVPSPFSGSGGCTDFSA7ISMLEDQDPATFIC			QGGKELP	0	1
L1_9_3hu3	DIQKQTSLSLGAFLGRVTIIC	IASQ	DISHYLN	WIDQKPKAKLLIY	YTSRLRS	GVPSPFSGSGGCTDFSA7ISMLEDQDPATFIC			QGGKELP	0	1
						GVPSPFSGSGGCTDFSA7ISMLEDQDPATFIC			QGGKELP	0	1

b) Secuencias de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo

nombre	CDR1			CDR2			CDR3				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1
L1_9_3	123456789012345678901234567890	12345678901234567890	123456789012345678901234567890	678901234567890	0123456789012345	67890123456789012345678901234			567890AUCDEFCHLJK12	1	1
huak1	EVQLVGGGLVQSGGSLRLSCKASGFTT	KYMKL	KDYAMS	WYQKPKGLEWVA	EINP	ANDRTNMEKPKY	KATLVYDRSSSTAYHQLTSLTSDSDAVYTCAL		GGGYAH	0	1
L1_9_3hu	EVQLVGGGLVQSGGSLRLSCKASGFTT	KYMKL	KDYAMS	WYQKPKGLEWVA	VIS	NGSDTTTADSVKQ	RETLSDUSNMPLYLQHNLSLQALDITAVYTCAR		GGGYAH	0	1
L1_9_3hu3	EVQLVGGGLVQSGGSLRLSCKASGFTT	KYMKL	KDYAMS	WYQKPKGLEWVA	EINP	ANDRTNMEKPKY	RETLSDUSNMPLYLQHNLSLQALDITAVYTCAL		GGGYAH	0	1
						ANDRTNMEKPKY	RETLSDUSNMPLYLQHNLSLQALDITAVYTCAL		GGGYAH	0	1

Figura 9

a)

scFv de L1_9.3

DIQMTQTTSSLSAFLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI
SNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKRTSGPGDGGKGGPKGPGGEGTKGTGPGGQVQLQPGAELVKS
GASVNLSCRASGYTFTRYWMLWVRQRPGHGLEWVGEINPRNDRNTNYNEKFKTKATLTVDRSSSTAYMQLTSLTSE
DSAVYFCALGGGYAMDYWGQGTSLTVSS

b)

L1_9.3Hu

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI
SSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKRTSGPGDGGKGGPKGPGGEGTKGTGPGGEVQLVQSGGGLVQS
GGSLRLSCRASGYTFTRYWMLWVRQRPGHGLEWVGEINPRNDRNTNYNEKFKTRFTISVDRSKSTAYLQMDSLRAE
DTAVYFCALGGGYAMDYWGQGTSLTVSS

c)

L1_9.3Hu3

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI
SSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKRTSGPGDGGKGGPKGPGGEGTKGTGPGGEVQLVQSGGGLVQS
GGSLRLSCRASGYTFTRYWMLWVRQRPGKGLEWVAEINPRNDRNTNYNEKFKTRFTISVDRSKNTLYLQMDSLRAE
DTAVYFCALGGGYAMDYWGQGTSLTVSS

Figura 10

a)

Anticuerpo de cadena sencilla murino L1-9.3

```

      NdeI
1  ACATATGAAA TACCTATTGC CTACGGCAGC CGCTGGATTG TTATTACTCG
   TGTATACTTT ATGGATAACG GATGCCGTCG GCGACCTAAC AATAATGAGC
      SfiI
      NcoI
51  CGGCCAGGCC GGCCATGGCC GATATTCAGA TGACCCAGAC CACGAGCAGC
   GCCGGGTCGG CCGGTACCGG CTATAAGTCT ACTGGGTCCTG GTGCTCGTCG
   L S A F L G D R V T I S C R A S Q
101 CTGAGCGCGT TTCTGGGCGA TCGTGTGACC ATTAGCTGCC GTGCGAGCCA
   GACTCGCGCA AAGACCCGCT AGCACACTGG TAATCGACGG CACGCTCGGT
   D I S N Y L N W Y Q Q K F D G T V
151 GGATATTAGC AACTATCTGA ACTGGTATCA GCAGAAACCG GATGGCACCG
   CCTATAATCG TTGATAGACT TGACCATAGT CGTCTTTGGC CTACCGTGGC
   K L L I Y Y T S R L H S G V P S
201 TGAAGTCTGT GATTATTAT ACCAGCCGTC TGCAATAGCGG TGTGCCGAGC
   ACTTTGACGA CTAATAATA TGGTCGGCAG ACGTATCGCC ACACGGCTCG
   R F S G S G S G T D Y S L T I S N
251 CGTTTITAGG GCAGCGGTAG CCGCACCGAT TATAGCCTGA CCATTCTTAA
   GCAAAATCGC CGTCGCCATC GCGGTGGCTA ATATCGGACT GGTAAGATT
   L E Q E D F A T Y F C Q Q G N T L
301 CCTGGAACAG GAAGATTITG CGACCTATTT TTGCCAGCAG GGCAACACCG
   GGACCTTGTG CTTCTAAAC GCTGGATAAA AACGGTCGTC CCGTTGTGCG
   P W T F G G G T K L E I K R T S
351 TGCCCTGGAC CTTTGGCGGT GGCACCAAAC TGGAAATTRA ACGTACTAGT
   ACGGCACCTG GAAACCGCCA CCGTGGTTTG ACCTTTAATT TGCATGATCA
   G F G D G G K G G P G K G P G G E
401 GGTCCGGGCG ATGGCGGTAA AGGCGGTCCG GGCAAAAGTC CCGTGGGCGA
   CCAGGCCCGC TACCGCCATT TCCGCCAGGC CCGTTTCCAG GCCCACCGCT
      SmaI
      XmaI
      AvaI
      PstI
451 AGGCACCAAA GGCACTGGGC CCGGGGGTCA GGTTCAGCTG CAGCAGCCGG
   TCCGTGGTTT CCGTGACCCG GCGCCCCAGT CCAAGTCGAC GTGCTCGGCC
   A E L V K S G A S V N L S C R A
501 GTGCGGAAGT GGTGAAAAGC GGCAGCAGCG TGAACCTGAG CTGCTCGTGG
   CACGCCTTGA CCACTTTTGC CCGCGCTCGC ACTTGGACTC GACAGCACCG
   S G Y T F T R Y W M L W V R Q R P
551 AGCGGCTATA CCTTACCCG TTATTGGATG CTGTGGGTGC GTCAGCGTCC
   TCCCGATAT GGAAATGGGC AATAACCTAC GACACCCAGC CAGTCCGAGG
   G R G L E W V G E I N P R N D R T
601 GGGCCACGGC CTGGAATGGG TGGGCGAAAT TAATCCGCGT AACGATCGTA
   CCCGTGCGCG GACCTTACCC ACCCGCTTAA ATTAGGCGCA TTGCTAGCAT
   N Y N E K F K T K A T L T V D R
651 CCAACTATAA CGAAAAATTC AAAACCAAAG CGACCCCTGAC CGTGGATCGT
   GGTTGATATT GCTTTTAAAG TTTTGGTTTC GCTGGGACTG GCACCTAGCA
   S S S T A Y M Q L T S L T S E D S
701 AGCAGCAGCA CCGCGTATAT GCAGCTGACG AGCCTGACCT CTGAAGATAG
   TCGTCTCGT GCGCGATATA CGTCGACTGC TCGGACTGGA GACTTCTATC
      BssHII
751 A V Y F C A L G G G Y A M D Y W G
   CGCGGTGTAT TTCTGCGCGC TGGGCGGTGG CTATGCGATG GATTATTGGG
   GCGCCACATA AAGACGCGCG ACCCGCCACC GATACGCTAC CTAATAACCC
      NotI
801 GCCAGGGCAC CAGCGTTACC GTGAGCAGCG GCGGTGCGGC CGCTGCACCA
   CGGTCCCGTG GTCGCAATGG CACTCGTCCG CCGCCAGCCG GCGACGTGGT
   S V F I F P P S D E Q L K S G T A
851 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC
   AGACAGAAGT AGAAGGGCGG TAGACTACTC GTCAACTTTA GACCTTGACG
   S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
901 CTCTGTTGTG TGCCTGCTGA ATAATTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC
   GAGACRACAC ACGGACGACT TATTGAAGAT AGGGTCTCTC CCGTTTCATG
   W K V D N A L Q S G N S Q E S V

```

Figura 10 a) cont.

```

951 AGTGGAAAGT GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTG
   TCACCTTCCA OCTATTGGCG GAGGTTAGCC CATTGAGGGT CCTCTCACAG

```

```

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

```

Figura 10

b)

Anticuerpo de cadena sencilla humanizado L1-9.3Hu

```

      NdeI
      M K Y L L P T A A A G L L L L A
1 ACATATGAAA TACCTATTGC CTACGGCAGC CGCTGGATTG TTATTACTCG
  TGTATACTTT ATGGATAACG GATGCCGTCG GCGACCTAAC AATAATGAGC
      SfiI
      A Q P A M A D I Q M T Q S P S S
51 CGGCCAGCC GCCCATGGCC GATATTCAGA TGACCCAGAG CCGGAGCAGC
  GCCGGGTCGG CCGGTACCGG CTATAAGTCT ACTGGGTCTC GGGCTCGTCG
  L S A S V G D R V T I T C R A S Q
101 CTGAGCCCGA GCGTGGGTGA TCGTGTGACC ATTACCTGCC GTGCGAGCCA
  GACTCGCGCT CGCACCCACT AGCACACTGG TAATGGACGG CACGCTCGGT
  D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P
151 GGATATTAGC AACTATCTGA ACTGGTATCA GCAGAAACCG GGCAAAGCCG
  CCTATAATCG TTGATAGACT TGACCATAGT CGTCTTTGGC CCGTTTCGGG
  K L L I Y Y T S R L H S G V P S
201 CGAAACTGCT GATTATTAT ACCAGCCGTC TGCATAGCGG TGTGCCGAGC
  GCTTTGACGA CTAATAATA TGGTCGGCAG ACGTATCGCC ACACGGCTCG
  R F S G S G S G T D Y T F T I S S
251 CGTTTTAGCG GCAGCGGTAG CCGCACCGAT TATACCTTTA CCATTAGCAG
  GCAAATCGC CGTCGCCATC GCCGTGGCTA ATATGGAAAT GGTAAATCGTC
      PstI
      L O P E D F A T Y F C Q Q G N T L
301 CCTGCAGCCG GAAGATTTTG CGACCTATTT TTGCCAGCAG GGCAACACGC
  GGACGTCCGG CTTCATAAAC GCTGGATAAA AACGGTCGTC CCGTTGTGGC
  F W T F G G G T K L E I K R T S
351 TGCCGTGGAC CTTTGGCGGT GGCACCAAAC TGGAAATTAA ACGTACTAGT
  ACGGCACCTG GAAACCCGCA CCGTGGTTTG ACCTTTAATT TGCATGATCA
  G P G D G G K G G P G K G P G G E
401 GGTCCGGGGC ATGGCCGTA AAGCCGTCGG GGCAAAGGTC CCGGTTGGCG
  CCAGGCCCGC TACCGCCATT TCCGCCAGGC CCGTTTCCAG GCCCACCGCT
      SmaI
      XmaI
      AvaI
      G T K G T G P G G E V Q L V Q S G
451 AGGCACCAA GGCACCTGGC CCGGGGGTGA AGTTCAGCTG GTGCAGAGCG
  TCCGTGGTTT CCGTGACCCG GCGCCCACT TCAAGTCGAC CACGTCCTCC
  G G L V Q S G G S L R L S C R A
501 CCGGTGGTCT GGTTCAGAGC GGTGCCAGCC TCGTCTGAG CTGTCGTGGC
  CGCCACCAAG CCAAGTCTCG CCACCGTCGG ACGCAGACTC GACAGCAGCC
  S G Y T F T R Y W M L W V R Q R P
551 AGCGGCTATA CCTTCACCGG TTATTGGATG CTGTTGGGTG GTGCGGTC
  TCGCCGATAT GGAAGTGGG AATAACCTAC GACACCCAGC CAGTCGCAGG
  G H G L E W V G E I N P R N D R T
601 GGGCCACGGC CTGGAATGGG TGGCGGAAAT TAATCCCGGT AACGATCGTA
  CCGGTTGCCG GACCTTACC ACCCGCTTTA ATTAGGCGCA TTGCTAGCAT
  N Y N E K F K T R F T I S V D R
651 CCAACTATAA CGAAAAATTT AAAACCGGCT TCACCATTAG CGTGGATCGT
  GGTGTATATT GCTTTTTAAA TTTTGGGCGA AGTGSTAATC GCACCTAGCA
      PstI
      S K S T A Y L Q N D S L R A E D T
701 AGCAAAAGCA CCGCGTATCT GCAGATGGAT AGCCTGCGTG CGGAAGATAC
  TCGTTTTCGT GCGCATAGA CGTCTACCTA TCGGACGCAC GCCTTCTATG
      BssHII
      A V Y F C A L G G G Y A M D Y W G
751 CGCGGTGTAT TTTTGGCGGC TGGCGGTGG CTATCGGATG GATTATTGGG
  GCGCCACATA AAAACGCGCG ACCCGCCACC GATACGCTAC CTAATAACCC
      NotI
      Q G T L V T V S S G G A A A A P
801 GCCAGGGCAC CCTGGTTACC GTGAGCAGCG GCGGTGCGGC CGCTGCACCA
  CGGTCCCGTG GGACCAATGG CACTCGTCGC CGCCACGCGG GCGACGTGGT
  S V F I F P P S D E Q L K S G T A
851 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACCTG
  
```

Figura 10 b) cont.

```

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

```

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

```

Figura 10

c)

Anticuerpo de cadena sencilla humanizado L1-9.3Hu3

```

      NdeI
      M K Y L L P T A A A G L L L L A
1 ACATATGAAA TACCTATTGC CTACGGCAGC CGCTGGATTG TTATTACTCG
  TGTATACTTT ATGGATAACG GATGCCGTCG GCGACCTAAC AATAATGAGC
      SfiI
      A Q P A M A D I Q M T Q S P S S
51 CGGCCAGCC GCCCATGGCC GATATTCAGA TGACCCAGAG CCCGAGCAGC
  GCCGGTCCG CCGGTACCGG CTATAAGTCT ACTGGGTCCT GGGCTCGTCG
  L S A S V G D R V T I T C R A S Q
101 CTGAGCGCGA GCGTGGGTGA TCGTGTGACC ATTACCTGCC GTGCGAGCCA
  GACTCGCGCT CGCACCCACT AGCACACTGG TAATGGACGG CACGCTCGGT
  D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P
151 GGATATTAGC AACTATCTGA ACTGGTATCA GCAGAAACCG GCCAAAGCGC
  CCTATAATCG TTGATAGACT TGACCATAGT CGTCTTTGGC CCGTTTCGGC
  K L L I Y Y T S R L H S G V P S
201 CGAAACTGCT GATTTATTAT ACCAGCCGTC TGCATAGCGG TGTGCCGAGC
  GCTTTGACGA CTAATAATA TGGTCGGCAG ACGTATCGCC ACACGGCTCG
  R F S G S G S G T D Y T L T I S S
251 CGTTTTAGCG GCAGCGGTAG CGGCACCGAT TATACCCTGA CCATTAGCAG
  GCAAAATCCG CGTCGCCATC GCGGTGGCTA ATATGGGACT GGTAAATCGT
      PstI
      L Q P E D F A T Y F C Q Q G N T L
301 CCTGCAGCCG GAAGATTTTG CGACCTATTT TTGCCAGCAG GGCAACACGC
  GGACGTCCGG CTCTAAAAC GCTGGATAAA AACGGTCGTC CCGTTGTGCG
  P W T F G G G T K L E I K R T S
351 TGCCGTGGAC CITTGGCCGT GGCACCAAAC TGGAAATTAA ACGTACTAGT
  ACGGCACCTG GAAACCGCCA CCGTGGTTTG ACCTTTAATT TGCAATGATCA
  G P G D G G K G G P G K G P G G E
401 GGTCCGGGCG ATGGCCGTAA AGGCCGTCCG GGCAAAAGTC CGGGTGGCGA
  CCAGGCCCGC TACCCGCATT TCCGCCAGCC CCGTTTCCAG GCCCACCGCT
      SmaI
      XmaI
      AvaI
      G T K G T G P G G E V Q L V Q S G
451 AGGCACAAA GGCAGTGGCC CCGGGGGTGA AGTTCAGCTG GTGCAGAGCC
  TCCGTGGTTT CCGTGACCCG GGCCCCACT TCAAGTCGAC CACGTCTCCG
  G G L V O S G G S L R L S C R A
501 GCGGTGGTCT GGTTCAGAGC GGTGGCAGCC TGCCTCTGAG CTGTCTGTGG
  CGCCACCAGA CCAAGTCTCG CCACCGTCGG ACGCAGACTC GACAGCAGCC
  S G Y T F T R Y W M L W V R Q R P
551 AGCGGCTATA CCTTTACCCG TTATTGGATG CTGTGGGTGC GTCAGCGTCC
  TCGCCGATAT GGAATGGGC AATAACCTAC GACACCCACG CAGTCGCAGG
  G K G L E W V A E I N P R N D R T
601 GGTAAAGCC CTGGAATGGG TGGCCGAAAT TAATCCCGCT AACGATCGTA
  CCCATTTCCG GACCTTACCC ACCGCCTTTA ATTAGGCCCA TTGCTAGCAT
  N Y N E K F K T R F T I S V D R
651 CCAACTATAA CGAAAATTTT AAAACCCGCT TCACCATTAG CGTGGATCGT
  GGTTGATATT GCITTTTAAA TTTTGGCCGA AGTGGTAATC GCACCTAGCA
      PstI
      S K N T L Y L Q M D S L R A E D T
701 AGCAAAAACA CCCTGTATCT GCAGATGGAT AGCCTGCGTG CGGAAGATAC
  TCGTTTTTGT GGGACATAGA CGTCTACCTA TCGGAGGCAC GCCTTCTATG
      BssHII
      A V Y F C A L G G G Y A M D Y W G
751 CGCGGTGTAT TTTTCCGCGC TGGCCGCTGG CTATCCGATG GATTATTGGG
  GCGCCACATA AAAACGCGCG ACCCGCCACC GATACGCTAC CTAATAACCC
      NotI
      Q G T L V T V S S G G A A A A P
801 GCCAGGGCAC CCTGGTTACC GTGAGCAGCG GCGGTCCGGC CGCTGCACCA
  CGGTCGCGTG GGACCAATGG CACTCGTCGC CGCCACGCGG GCGACGTGGT
  S V F I F P P S D E Q L K S G T A
  
```

Figura 10 c) cont.

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

```

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

```

Figura 11

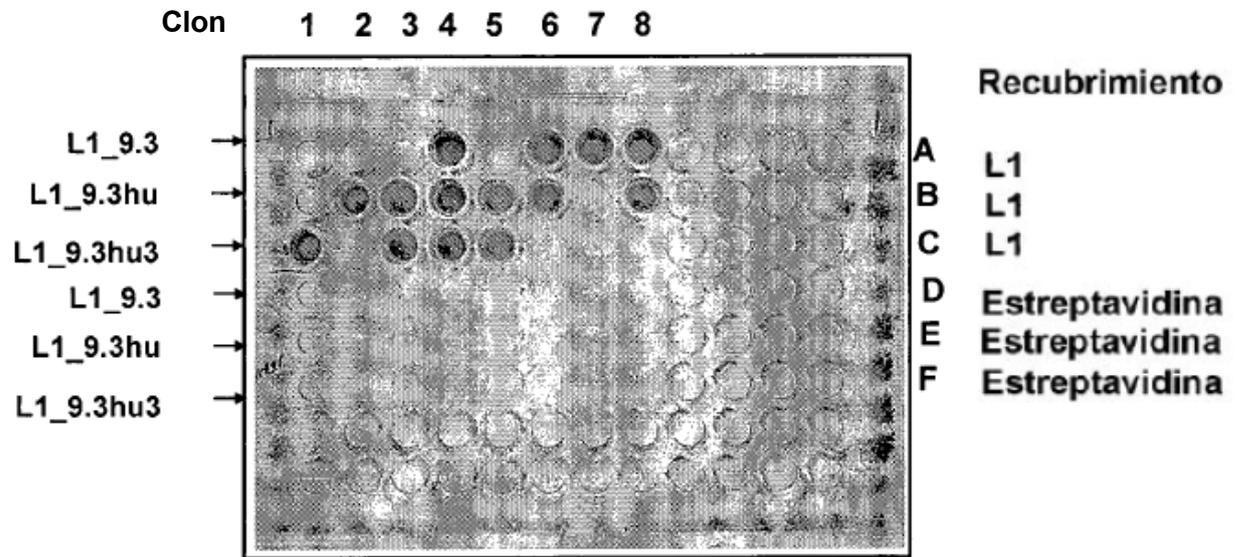


Figura 12

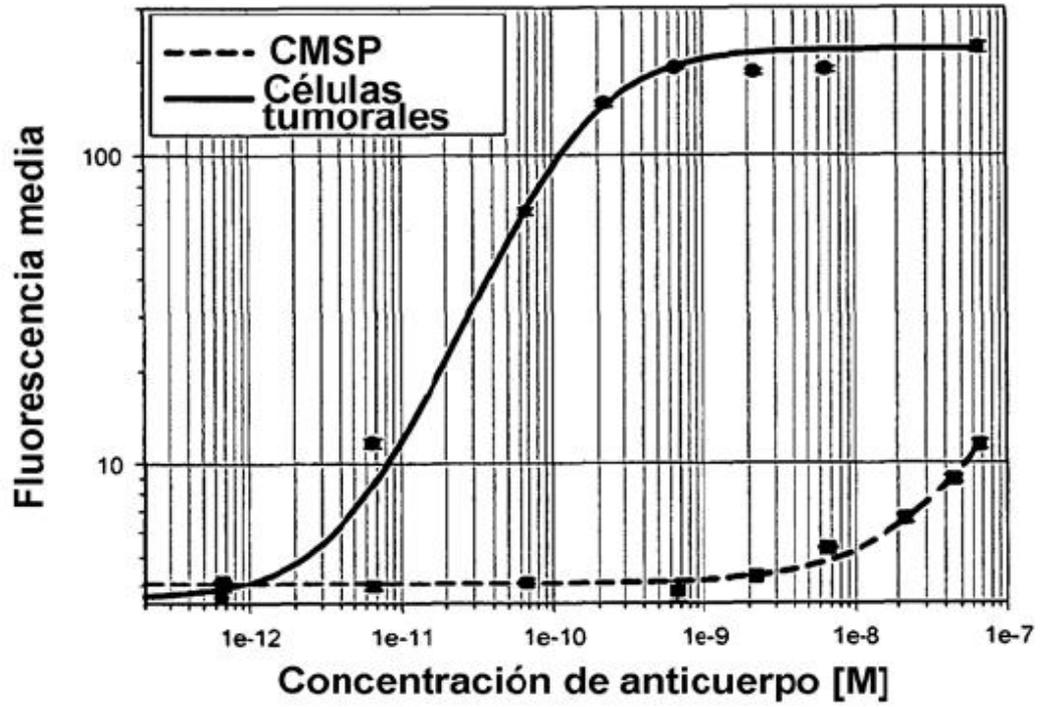
a)

GAAGAGTTAGCCTTGCAGCTGTGCTCAGCCCTAAATAGTTCCCAAAAATTTGCATGCTCTCACTTC
 CTATCTTTGGGTACTTTTTTCATATACCAGTCAGATTGTGAGCCATTGTAATTGAAGTCAAGACTCA
 GCCTGGACATGATGTCTCTGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTCTTCAAGGTAAAAGT
 TACTACAATGGGAATTTTGGCTGTTGCACAGTGATTCTTGTGACTGGAATTTTGGAGGGGTCTTT
 CTTTTCTGCTTAACTCTGTGGGTATTTATTGTGTCTCCACTCCTAGGTACCAGATGTGATATCCA
 GATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTTTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAG
 GGCAAGTCAAGGACATTAGCAATTAATTAACCTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTTAAA
 CTCCTTATCTATTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGT
 CTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATTTGCCACTTACTTTTGGC
CAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACATTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTAAA
 TAGAATCCAAAGTCTCTTTCTCCGTTGTCTATGTCTGTGGCTTCTATGTCTACAAATGATGTAT

b)

TTCAGCATCCTGATTCCTGACCCAGGTGTCCCTTCTTCTCCAGCAGGAGTAGGTGCTCATCTAAT
 ATGTATCCTGCTCATGAATATGCAAATCCTCTGAATCTACATGGTAAATGTAGGTTTGTCTATATCA
 CACACAGAAAAACATGAGATCACAGTTCTCTCTACAGTFACTGAACACACAGGACCTCACCAATGG
GATGGAGCTATATCATCTCTTTTTGGTAGCAACAGCTACAGGTAAGGGGCTCACAGTAGAAGG
 CTTGAGGTCTGGCCATATACATGGGTGACAGTGACATCCACTTTGCCTTTCTTTCCACAGATGTC
 CACTCCCAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGTCTGGGGCTTCAGTGAAC
 CTGCTCTGCAGGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGATACTGGATGCTCTGGGTGAGGCAGAGG
 CCTGGACATGGCCTTGAGTGGGTGGAGAGATTAACTCTCGCAACGATCGTACTAATTACAATG
 AGAAATCAAGACCAAGGCCACACTGACTGTAGACCGATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAAC
 TCACCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCCCTGGGGGGGGGCTATGCTAT
GGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGGTCT
 TAATTTTAACTTTGTTATGGAGTTTTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATTTGTCCCTGAG
 GGAGCCGGCTGAGAGAAGTTGGGAAATAAAGTGTCTAGGGATCTCAGAGCCTTAGGACAGATT
 A

Figura 13



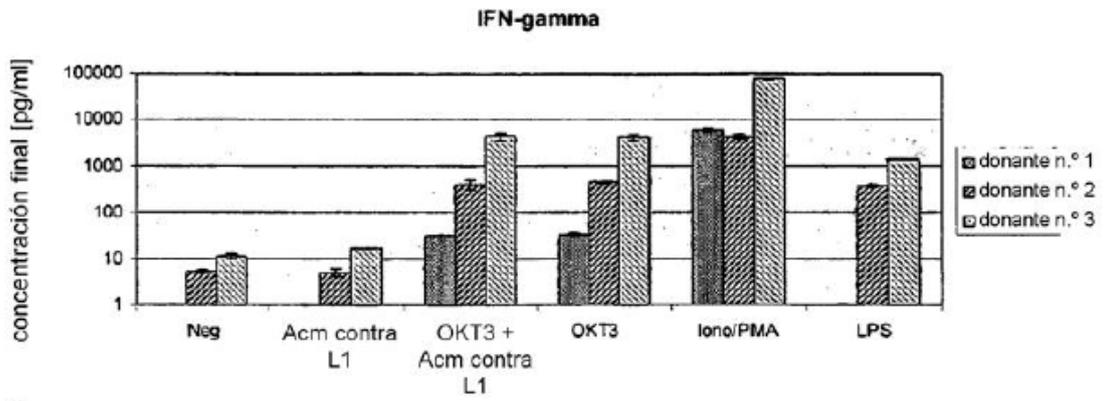
A)

B)

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

Figura 14

A)



B)

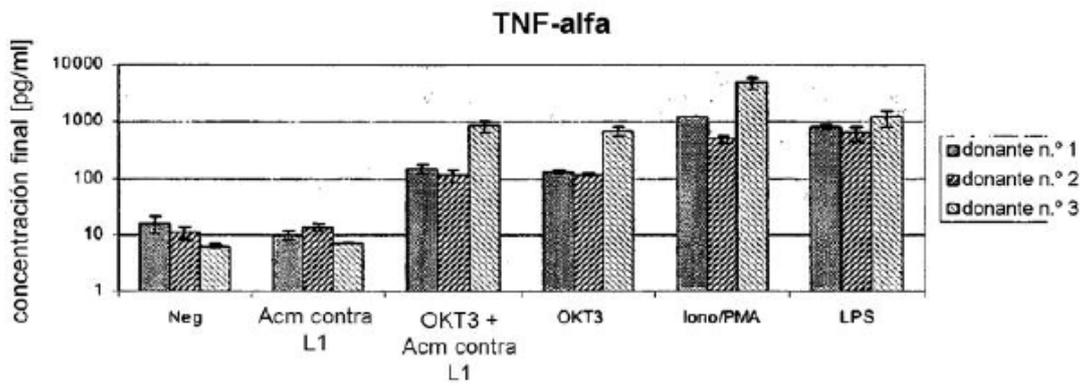


Figura 15

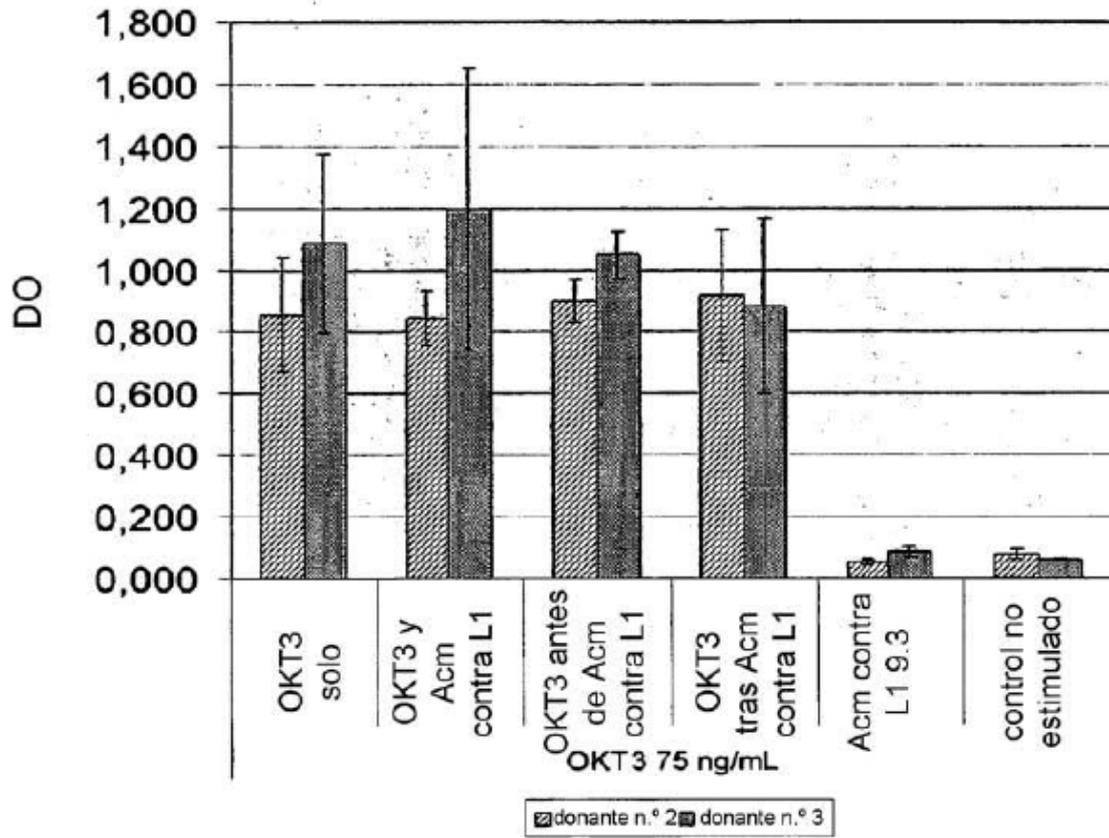


Figura 16

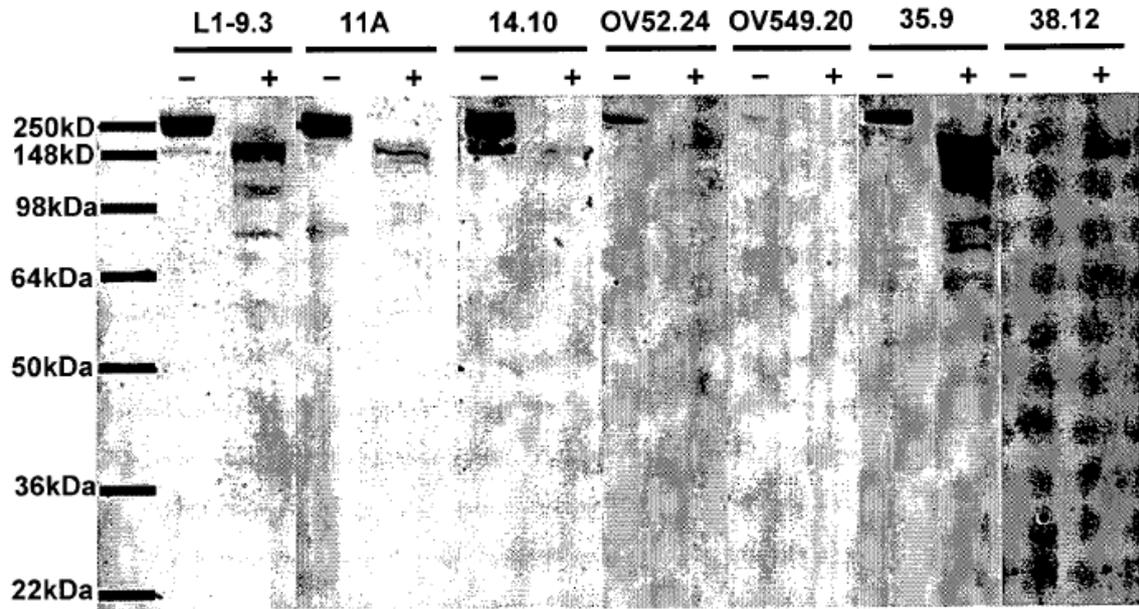


Figura 17

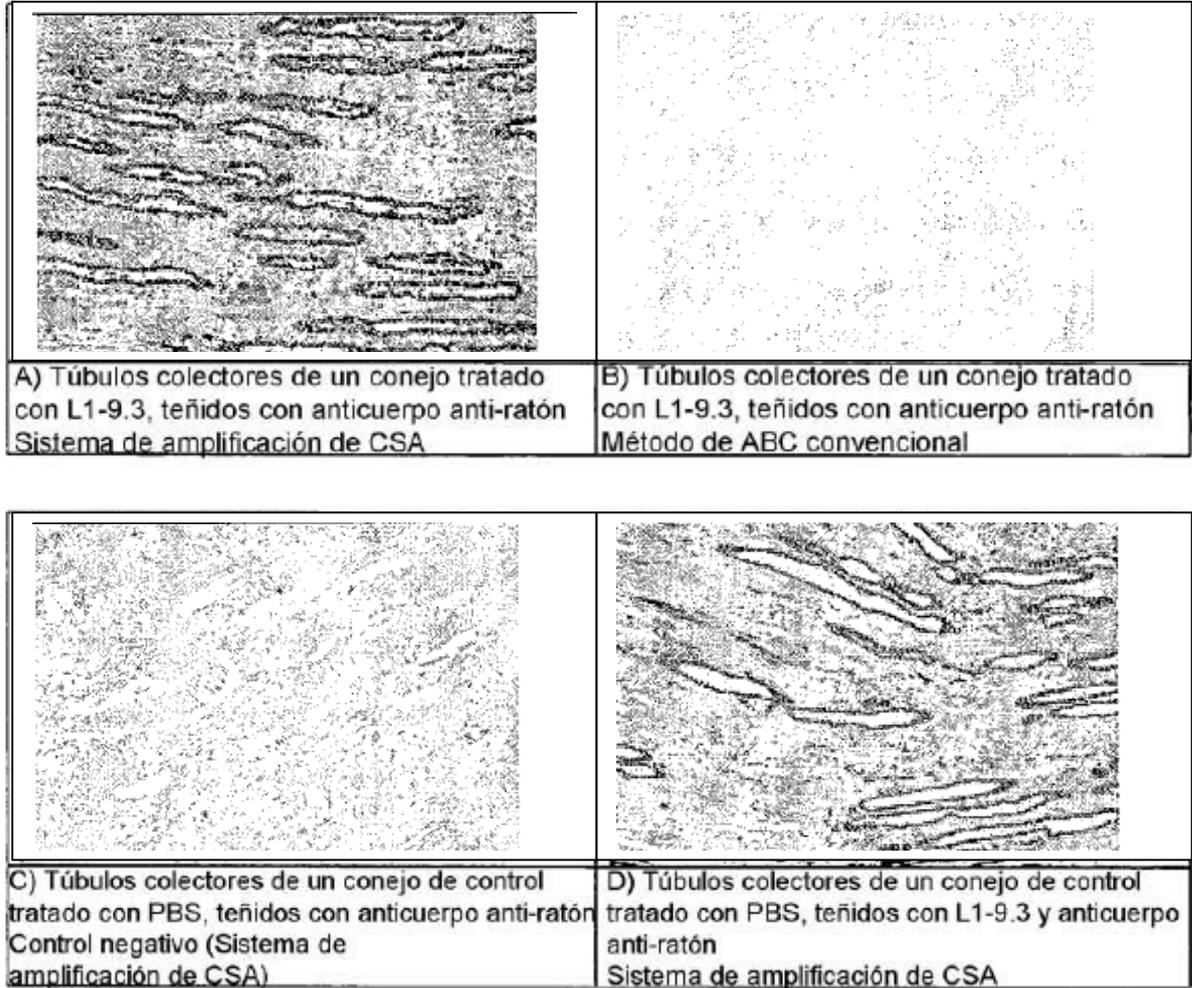
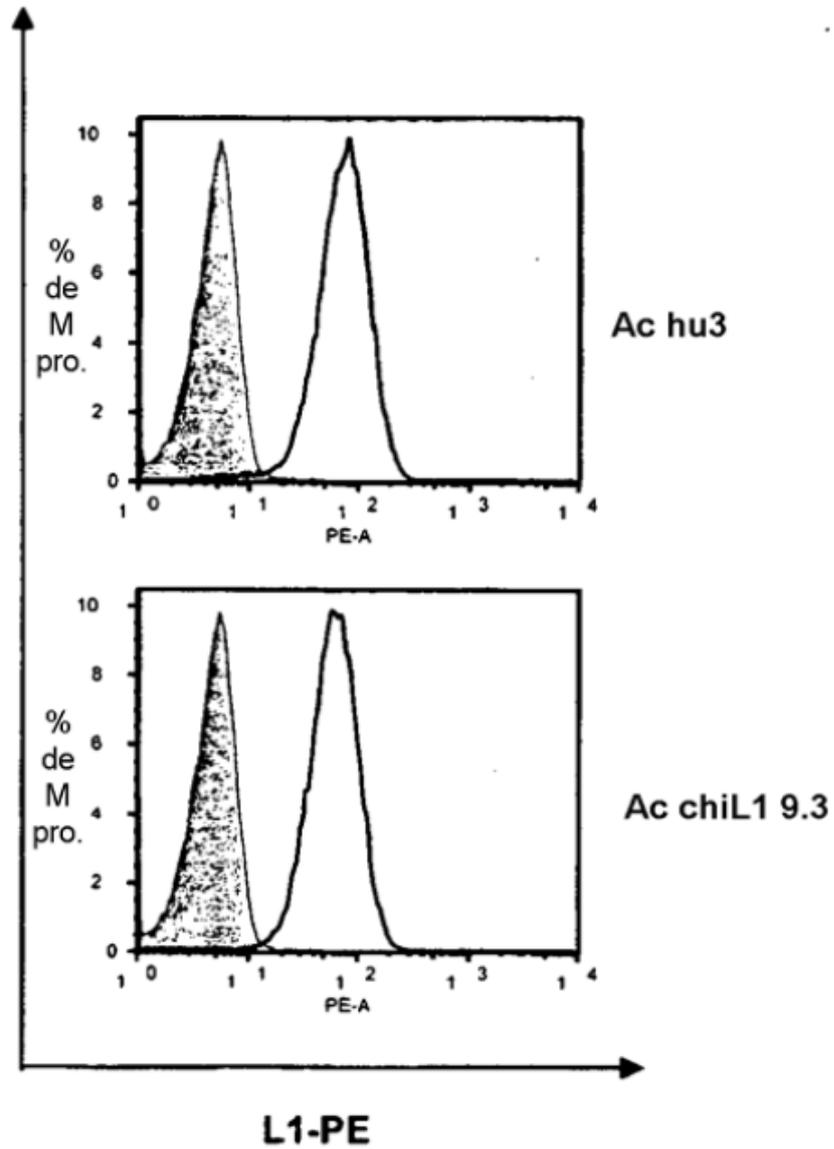


Figura 18



SKOV3ip con pcDNA3.1-luciferasa

Figura 19

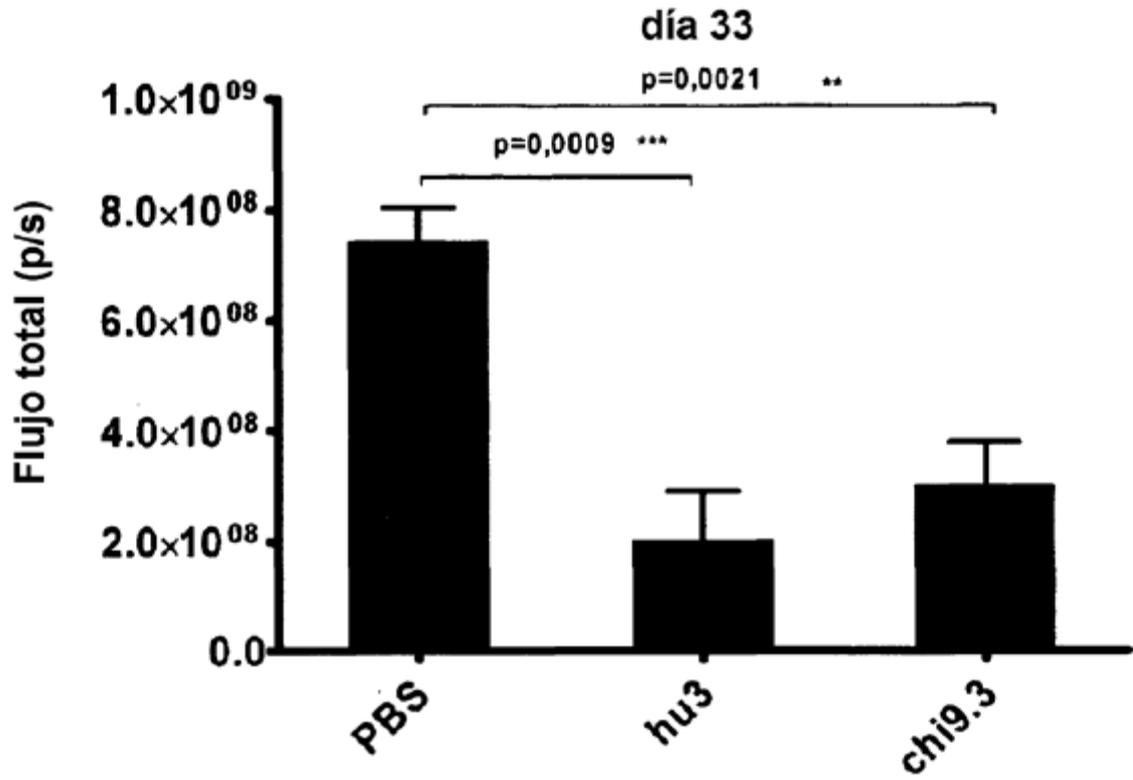


Figura 20

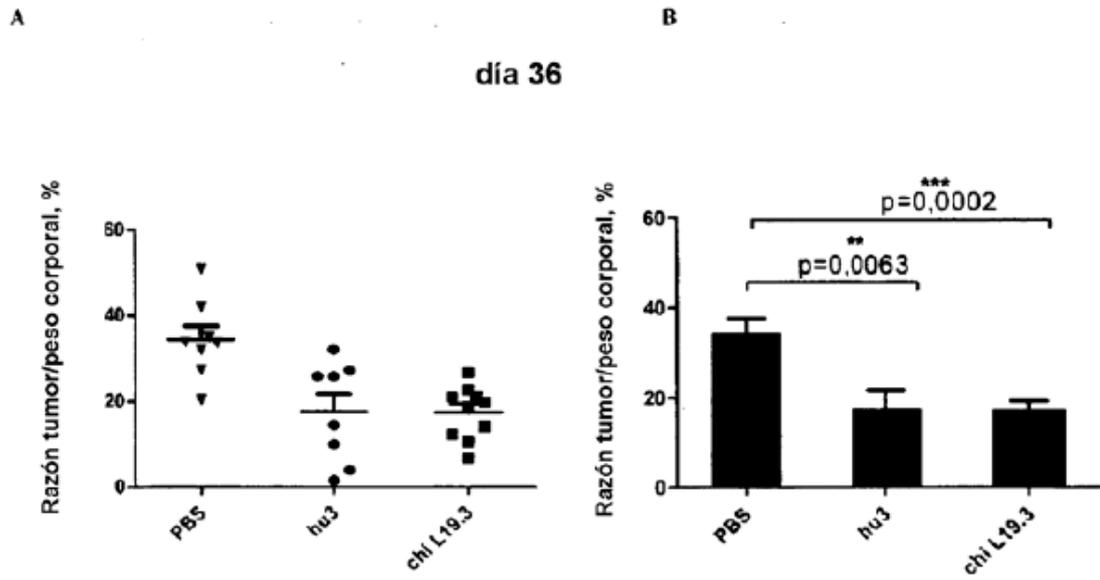


Figura 21 A

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

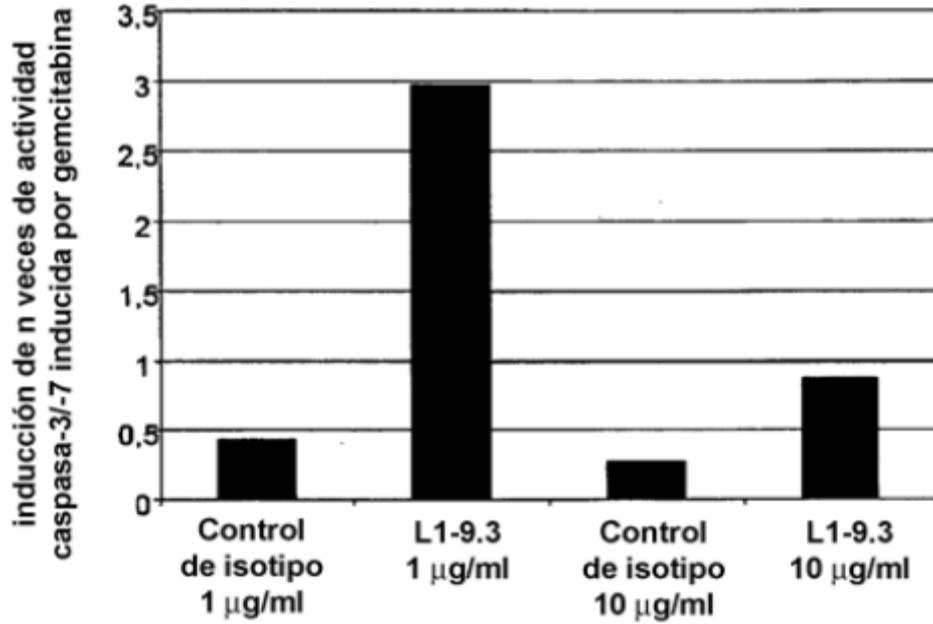


Figura 21 B

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

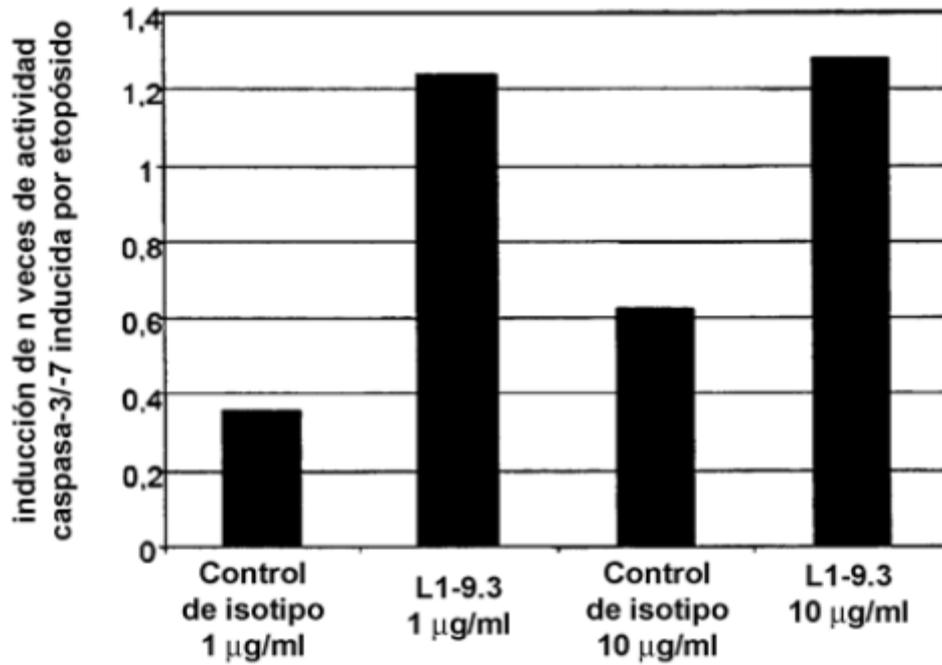


Figura 22 A

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

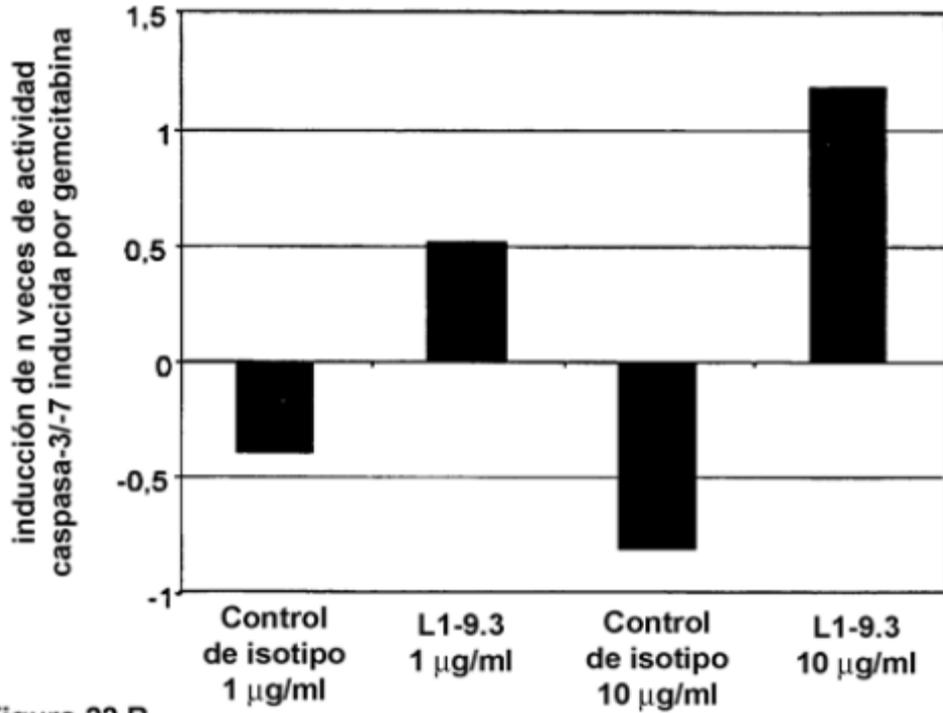


Figura 22 B

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

