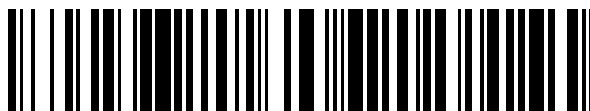


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 622**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2012 PCT/IL2012/050267**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13014668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2012 E 12817661 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2734551**

54 Título: **Variantes de anticuerpos monoclonales inmunomoduladores humanizados**

30 Prioridad:

**24.07.2011 US 201161511055 P**

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

**20.04.2018**

73 Titular/es:

**CURE TECH LTD. (100.0%)  
Hayarkon Street 42  
81227 Yavne, IL**

72 Inventor/es:

**ROTEM-YEHUDAR, RINAT y  
SCHICKLER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 664 622 T3

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

**Variantes de anticuerpos monoclonales inmunomoduladores humanizados****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

**[0001]** La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia y se refiere más específicamente a anticuerpos monoclonales humanizados útiles para la terapia de una variedad de indicaciones, en particular en el tratamiento de cáncer y trastornos de inmunodeficiencia.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**[0002]** El rápido aumento de los conocimientos en los últimos años acerca de las bases moleculares y celulares de la regulación inmune, en particular a nivel de las respuestas de células T, proporciona un nuevo arsenal de enfoques inmunoterapéuticos, incluyendo el desarrollo de vacunas anti-tumorales. Ciertos anticuerpos monoclonales mostraron tener actividad inmunomoduladora que incluye la capacidad de unir determinantes en la superficie de las células T e inducir la proliferación, activación, maduración o diferenciación de estas células.

15

**[0003]** La BAT (también denominada mBAT-1 o BAT-1) es un anticuerpo monoclonal murino generado contra una preparación de membrana de una línea celular de linfoma de Burkitt (Daudi) que mostró efectos antitumorales e inmunoestimulantes frente a diversos tipos de tumores. (Hardy et al., 2001, Int. J. Oncol., 19: 897). Este anticuerpo monoclonal se describió inicialmente en la Patente de Estados Unidos N° 5.897.862 de Hardy et al. BAT-1 es secretada por la línea celular de hibridoma que tiene el número de acceso de CNCM I-1397. El efecto inmunomodulador de la BAT murina también se estudió in vitro. BAT murina activa las células T CD4+ e induce la secreción de IFN- $\gamma$  desde estas células (Hardy et al., 2000, Int. Immunol. 12: 1623 y Quaglino E. et al., 2005, Vaccine 9:23 (25): 3280-7). Además, se encontró que BAT desencadena la proliferación de células T y aumenta su actividad citolítica (Hardy, B. y col., 1997, Hum. Antibodies, 8:95).

20

25

**[0004]** El polinucleótido y secuencias de aminoácidos de BAT murino se dan a conocer en el documento WO 00/58363, a Hardy et al., y la patente de Estados Unidos N° 7.695.715.

30

**[0005]** Un número de anticuerpos monoclonales humanizados (mAb) en base a BAT murino se dan a conocer en la patente de EE.UU. N° 7.332.582. En realizaciones particulares del documento US 7.332.582, los anticuerpos monoclonales humanizados comprenden una región variable de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 1-4 (denominada BATRK<sub>D</sub>, BATRK<sub>A</sub>, BATRK<sub>B</sub> y BATRK<sub>C</sub>, respectivamente) y una región variable de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO: 5-9 (denotado BATRH<sub>C</sub>, BATRH<sub>A</sub>, BATRH<sub>B</sub>, BATRH<sub>D</sub> y BATRH<sub>E</sub>, respectivamente). La secuencia de aminoácidos de las variantes de anticuerpo de cadena ligera y pesada se representa en la Tabla 1 a continuación. Los residuos que difieren en dichas regiones variables se representan con un fondo gris (posiciones 2, 30, 69, 77, 97 y 98 de la región clara y posiciones 35, 69, 70 y 71 de la cadena pesada).

35

40

**[0006]** Según la US 7.332.582, los anticuerpos BAT monoclonales humanizados parecen inducir un mayor efecto antitumoral que los inducidos por el anticuerpo BAT murino progenitor. Entre los diversos sistemas modelo probados, se estudió la actividad antitumoral de BAT en ratones SCID (enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave), ratones beige que son deficientes en células NK y ratones desnudos que son deficientes en células T (Hardy, B., 1997, Proc. Natl Acad. Sci. USA 94: 5756). Todos los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con células de melanoma B16 murinas que posteriormente desarrollaron tumores en los pulmones. Los anticuerpos BAT ejercían un efecto antitumoral solo en ratones SCID que se injertaron con linfocitos murinos o humanos. En los ratones desnudos atímicos y los ratones BAT beige, los anticuerpos BAT ejercían una actividad antitumoral, aunque esta actividad era menos efectiva en comparación con la actividad antitumoral de los anticuerpos BAT en los ratones de tipo salvaje.

45

50

**[0007]** Se debe tener en cuenta que no se espera que los anticuerpos MTD se orienten a las células tumorales por sí mismas, sino más bien las células de funcionamiento inmune del sujeto o paciente, con el fin de modular la respuesta inmune de una manera beneficiosa.

55

**[0008]** Berger y col. (2008) describe la administración del anticuerpo monoclonal humanizado CT-011, que se basa en mBAT-1, a pacientes con neoplasias malignas hematológicas avanzadas, y farmacocinética asociada (Berger y col., Clin. Cancer Res. 2008; 14 (10) 15 de mayo, 2008).

60

**[0009]** El documento WO 09/101611 se refiere a métodos para inhibir el crecimiento tumoral, aumentar la supervivencia de un sujeto que tiene un tumor e inducir la protección contra la recurrencia tumoral en un mamífero, que comprende administrar un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende regiones CDR derivadas del anticuerpo monoclonal murino designado mBAT-1, en combinación con al menos un agente quimioterapéutico.

65

**[0010]** En ninguna parte de la técnica anterior se enseña o sugiere que el uso de un anticuerpo monoclonal MBAT-1 humanizado que comprende al menos una modificación de aminoácidos específica al sitio sea ventajoso para la

terapia de una variedad de indicaciones, en particular en el tratamiento del cáncer y enfermedades y trastornos relacionados con la inmunodeficiencia.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 [0011] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales humanizados mutados o fragmentos de los mismos, que tienen modificaciones de aminoácidos específicas a sitio, incluyendo pero no limitado a, sustituciones y  
10 deleciones de aminoácidos, en comparación con los anticuerpos monoclonales humanizados conocidos HBAT-1. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos, y su uso para el tratamiento de cáncer y trastornos de inmunodeficiencia. En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados de la invención retienen la actividad inmunomoduladora de hBAT-1, se unen a células linfoblastoides B e inducen la proliferación y activación de linfocitos de sangre periférica.

15 [0012] Los anticuerpos demuestran características superiores, por ejemplo, bioactividad mejorada y estabilidad y/o inmunogenicidad reducida, en virtud de una modificación específica de al menos un aminoácido de las variantes de anticuerpos HBAT-1, como se detalla en el presente documento a continuación.

**Tabla 1- La región variable y constante de la cadena ligera y pesada hBAT-1 conocida**

Cadena lg	Región	Secuencia de aminoácido		SEQ ID NO:
Cadena ligera	Variable	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSARSSVS YMHWFQKPKGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTISYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLTFGGGKLEIK	BATRK <sub>D</sub>	1
	Variable	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSARSSVS YMHWFQKPKGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDEFLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLTFGGGKLEIK	BATRK <sub>A</sub>	2
	Variable	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSARSSVS YMHWFQKPKGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDYFLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLTFGGGKLEIK	BATRK <sub>B</sub>	3
	Variable	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSARSSVS YMHWFQKPKGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLTFGGGKLEIK	BATRK <sub>C</sub>	4
	Constante	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC		10
	Variable (BATRK <sub>D</sub> ) + Constante	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSARSSVS YMHWFQKPKGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTISYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC		11
Cadena pesada	Variable	QVQLVQSGSELKPKPGASVKISCKASGYTF NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFLDTSVNTAYLQITSLTAED TGMVFCRVGYDALDYWGQGLVTVSS	BATRH <sub>C</sub>	5
	Variable	QVQLVQSGSELKPKPGASVKISCKASGYTF NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFLDTSVSTAYLQITSLTAED TGMVFCRVGYDALDYWGQGLVTVSS	BATRH <sub>A</sub>	6
	Variable	QVQLVQSGSELKPKPGASVKISCKASGYTF NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFLDTSVSTAYLQITSLTAED TGMVFCRVGYDALDYWGQGLVTVSS	BATRH <sub>B</sub>	7
	Variable	QVQLVQSGSELKPKPGASVKISCKASGYTF NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFLDTSVNTAYLQITSLTAED TGMVFCRVGYDALDYWGQGLVTVSS	BATRH <sub>D</sub>	8

Cadena lg	Región	Secuencia de aminoácido		SEQ ID NO:
5	Variable	Q <del>Y</del> QLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTF <del>E</del> NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINT <b>DS</b> GESTY AEEFKGRF <del>F</del> SLDTSV <del>N</del> TAYLQITSLTAED TGM <del>Y</del> FC <del>V</del> RVGYDALDY <b>WG</b> QGLVTVSS	BATRH <sub>E</sub>	9
10	Constante	AS <b>TK</b> GP <b>S</b> VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSW <b>NS</b> GALTS <del>G</del> VHTFPVAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV <b>NH</b> KPS NTKVDKRVEPKSC <b>DK</b> TH <b>T</b> CPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HED <b>PE</b> VKFNWYV <b>DG</b> VEVHNAKTKPREEQ <b>YN</b> <b>S</b> TYRVVSVLTVLHQDWL <b>NG</b> KEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES <b>NG</b> QP ENNYKTPPVLD <b>SD</b> GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFS <del>C</del> SV <b>M</b> HEALH <b>NH</b> YTQKSLSLSPG <b>K</b>		12
25	Variable (BATRK <sub>C</sub> ) + Constante	Q <del>Y</del> QLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTF <del>E</del> NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINT <b>DS</b> GESTY AEEFKGRF <del>F</del> SLDTSV <del>N</del> TAYLQITSLTAED TGM <del>Y</del> FC <del>V</del> RVGYDALDY <b>WG</b> QGLVTVSSAST KGP <b>S</b> VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSW <b>NS</b> GALTS <del>G</del> VHTFPVAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV <b>NH</b> KPSNTK VDKRVEPKSC <b>DK</b> TH <b>T</b> CPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED <b>PE</b> VKFNWYV <b>DG</b> VEVHNAKTKPREEQ <b>YN</b> <b>S</b> TY RVVSVLTVLHQDWL <b>NG</b> KEYKCKVSNKALPA PIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES <b>NG</b> QPENN YKTPPVLD <b>SD</b> GSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFS <del>C</del> SV <b>M</b> HEALH <b>NH</b> YTQKSLSLSPG <b>K</b>		13

45 **[0013]** La Tabla 1 enumera las secuencias de aminoácidos de las regiones variables y constantes de las cadenas ligera y pesada de las variantes del anticuerpo hBAT-1. El al menos un aminoácido que está sustituido para producir los anticuerpos de la invención, se representa en negrita. El al menos un aminoácido se selecciona del grupo que consiste en: los aminoácidos en las posiciones 5, 20, 71, 75, 76, 93 y 97 de SEQ ID NO: 1; los aminoácidos en las posiciones 54, 55 y 107 de SEQ ID NO: 5, aminoácidos en las posiciones 157, 158, 169, 170 de SEQ ID NO: 11; y los aminoácidos en las posiciones 120, 124, 159, 160, 203, 204, 221, 222, 225, 252, 270, 271, 280, 281, 297, 298, 315, 316, 384, 385, 399, 400, 401, 402, 434, 435, 447 y 428 de SEQ ID NO: 13.

55 **[0014]** De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo BAT-1 humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos como la expuesta en la SEQ ID NO: 30, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 31.

60 **[0015]** La presente invención también proporciona una secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento del mismo, un vector que comprende la secuencia de polinucleótidos, una célula huésped que contiene el vector, una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, y un vehículo, diluyente o estabilizador farmacéuticamente aceptable, y el uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para la preparación de un medicamento para tratar un tumor. Las realizaciones preferidas de la presente invención se describen en las reivindicaciones adjuntas.

65 **[0016]** Sin desear estar ligado por ninguna teoría o mecanismo de acción, la modificación de uno o ambos aminoácidos de los siguientes pares de aminoácidos: Asn-Ser; Asp-Ser; Asn-His; o Asn-Gly, reduce el riesgo de desamidación aumentando de ese modo la solubilidad del anticuerpo. La modificación de aminoácido puede estar en

una posición seleccionada del grupo que consiste en: Asn 75, Ser 76 de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 u 11. La modificación de aminoácido puede estar en una posición seleccionada del grupo que consiste en: Asn 157, Ser 158 de SEQ ID NO: 10. La modificación de aminoácido también puede estar en una posición seleccionada del grupo que consiste en: Asn 159, Ser 160, Asn 297, Ser 298 de SEQ ID NO: 11.

**[0017]** De acuerdo con diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención tiene una actividad antitumoral de similar o mayor que, MBAT-1. De acuerdo con otra realización, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una actividad antitumoral similar, o mayor que, hBAT-1. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener una estabilidad mejorada en comparación con hBAT-1.

**[0018]** De acuerdo con diversas realizaciones, el fragmento del anticuerpo humanizado se selecciona del grupo que consiste en: Fv, F (ab'), F (ab')<sub>2</sub>, y un anticuerpo de cadena sencilla.

**[0019]** De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo.

**[0020]** De acuerdo con todavía otra realización, se proporciona un vector que comprende la secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo. El vector que comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo de la invención o sus fragmentos se puede seleccionar del grupo que consiste en: anticuerpo humanizado completo, la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, ambas cadenas de la región variable.

**[0021]** Según otro aspecto, se proporciona células huésped que contienen un vector que comprende la secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo.

**[0022]** Según otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo el anticuerpo de la invención o fragmento de unión de antígeno del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o estabilizador.

**[0023]** De acuerdo con otra realización, la composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo el anticuerpo de la invención es para uso en el tratamiento del cáncer. La composición farmacéutica puede administrarse después de la detección de tumores primarios o secundarios en un sujeto, o como terapia preventiva de un sujeto que tiene un alto riesgo de desarrollar cánceres. El anticuerpo de la invención provoca efectos antitumorales en una variedad de tumores.

**[0024]** En una realización, el sujeto tiene un tumor seleccionado de un tumor sólido o un tumor no sólido. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor sólido. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor no sólido. En algunas realizaciones, el tumor no sólido es una malignidad hematológica.

**[0025]** En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de un carcinoma colorrectal, un cáncer de pulmón no pequeño (NSCLC), un cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), un carcinoma de mama; un melanoma; un carcinoma ovárico, un carcinoma cervical, un cáncer pancreático, un carcinoma de cabeza y cuello, un carcinoma gastrointestinal, un tumor esofágico, un carcinoma hepatocelular, mieloma múltiple, un carcinoma de células renales, un tumor de próstata, un linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, linfoma de células del manto, sarcoma de Kaposi, un carcinoma de células escamosas, un carcinoma de células basales, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC). Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

**[0026]** De acuerdo con realizaciones específicas, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en: carcinoma colorrectal, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de cabeza y cuello, tumor esofágico, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, linfoma no Hodgkin y enfermedad de Hodgkin.

**[0027]** El sujeto puede ser un mamífero no humano o un ser humano.

**[0028]** En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, para uso en el tratamiento de un tumor. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una modificación de aminoácido en la posición Phe97 de la región variable de la cadena ligera y Trp107 de la región variable de la cadena pesada, para uso en el tratamiento de un tumor.

**[0029]** Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0030]** La **Figura 1** es un gráfico que demuestra la viabilidad de los linfocitos T CD4+ después de la incubación con

el anticuerpo monoclonal humanizado BAT-1 (denominado CT-011) y un doble mutante CT-011 que comprende sustituciones de alanina en la posición Phe 97 de la región variable de la cadena ligera y Trp 107 de la región variable de la cadena pesada.

5 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

10 **[0031]** La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales humanizados, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos, y el uso de los mismos para el tratamiento de una variedad de indicaciones, incluyendo, pero no limitado a cáncer y los trastornos de inmunodeficiencia. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos modificados o fragmentos de los mismos que tienen modificaciones de aminoácidos específicas tales como, sustituciones de aminoácidos, en comparación con las variantes de anticuerpos inmunomoduladores monoclonales humanizados hBAT-1.

15 **[0032]** La región variable de la cadena ligera (una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4) se modifica mediante la sustitución de Phe 97 por Ala.

**[0033]** La región variable de la cadena pesada (cualquiera de SEQ ID NO: 5-9) se modifica por una sustitución de Trp 107 a Ala.

20 **[0034]** De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una modificación de aminoácido en las posiciones Trp107 de la región variable de la cadena pesada y Phe97 de la región variable de la cadena ligera. Dicha modificación es una sustitución de un residuo de alanina.

25 **Tabla 2- Región variable ejemplar de la cadena ligera y pesada mutada hBAT-1 que comprende sustituciones de aminoácidos F93, F97 o W107.**

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 664 622 T3

Cadena lg	Basado en	Secuencia de aminoácido	Sustitución	SEQ ID NO:
Región variable de cadena ligera	BATRK <sub>D</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTSYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SS <b>X</b> PLTFGGGTKLEIK	F93A, F93L o F93V	14
	BATRK <sub>D</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTSYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLT <b>X</b> GGGTKLEIK	F97A, F97L o F97V	15
	BATRK <sub>A</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWYQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQR SS <b>X</b> PLTFGGGTKLEIK	F93A, F93L o F93V	16
	BATRK <sub>A</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWYQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLT <b>X</b> GGGTKLEIK	F97A, F97L o F97V	17
	BATRK <sub>B</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDYTLTINSLQPEDFATYYCQQR SS <b>X</b> PLTFGGGTKLEIK	F93A, F93L o F93V	18
	BATRK <sub>B</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDYTLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLT <b>X</b> GGGTKLEIK	F97A, F97L o F97V	19
		SSFPLT <b>X</b> GGGTKLEIK		
	BATRK <sub>C</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SS <b>X</b> PLTFGGGTKLEIK	F93A, F93L o F93V	20
	BATRK <sub>C</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWFQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SSFPLT <b>X</b> GGGTKLEIK	F97A, F97L o F97V	21
	BATRK <sub>D</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWYQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQR SS <b>X</b> PLT <b>X</b> GGGTKLEIK	F93 y F97 a A, L o V	22
	BATRK <sub>D</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVS YMHWYQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQR SS <b>A</b> PLT <b>A</b> GGGTKLEIK	F93A y F97A	23



Cadena lig	Basado en	Secuencia de aminoácido	Sustitución	SEQ ID NO:	
5	BATRK <sub>D</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVS YMHWFQQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTISYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SS <b>A</b> PLTFGGGTKLEIK	F93A	29	
10	BATRK <sub>D</sub>	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSARSSVS YMHWFQQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSR FSGSGSGTISYCLTINSLQPEDFATYYCQQR SS <b>F</b> PLT <b>A</b> GGGTKLEIK	F97A	30	
15	Región variable de cadena pesada	BATRK <sub>C</sub>	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFT NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLTAED TGMVFCVRVGYDALDY <b>X</b> GQGTLVTVSS	W107A, W107L, W107Y W107V	24
20		BATRK <sub>A</sub>	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFS NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQITSLTAED TGMVFC <b>A</b> KVGYDALDY <b>X</b> GQGTLVTVSS	W107A, W107L, W107Y W107V	25
25		BATRK <sub>B</sub>	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFT NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQITSLTAED TGMVFC <b>A</b> KVGYDALDY <b>X</b> GQGTLVTVSS	W107A, W107L, W107Y W107V	26
30		BATRK <sub>D</sub>	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFT NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLTAED TGMVFCVRVGYDALDY <b>X</b> GQGTLVTVSS	W107A, W107L, W107Y W107V	27
35		BATRK <sub>E</sub>	QIQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFT NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFAFSLDTSVNTAYLQITSLTAED TGMVFCVRVGYDALDY <b>X</b> GQGTLVTVSS	W107A, W107L, W107Y W107V	28
40		BATRK <sub>C</sub>	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFT NYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTY AEEFKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLTAED 1	W107A	31
45			IGMYFCVRVGYDALDY <b>A</b> GQGTLVTVSS		

[0035] De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo. Por consiguiente, el anticuerpo modificado se produce por expresión de polinucleótidos, en donde los polinucleótidos pueden codificar el anticuerpo humanizado completo o la región variable de la cadena ligera o la región variable de la cadena pesada o la región variable de ambas cadenas del anticuerpo humanizado. Además, el anticuerpo humanizado puede expresarse en una célula hospedadora después de la cotransfección de vectores distintos comprendiendo cada uno de ellos polinucleótidos que codifican la cadena pesada o ligera, o mediante la transfección de un único vector que comprende secuencias de polinucleótidos tanto de cadena ligera como pesada.

[0036] De acuerdo con todavía otra realización, se proporciona un vector que comprende la secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo modificado de la invención o fragmentos del mismo.

[0037] De acuerdo con todavía otra realización, se proporciona un vector que comprende la secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo modificado de la invención o fragmentos del mismo seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpo humanizado entero, la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, ambas cadenas de la región variable.

[0038] De acuerdo con otra realización, el vector comprende además al menos una secuencia que codifica un

componente seleccionado del grupo que consiste en: genes de resistencia, promotor, péptido de señal, terminador de la transcripción poliA, marcadores de selección, región constante humana genómica kappa.

5 **[0039]** Los componentes del vector pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en: gen de resistencia a ampicilina, gen de resistencia a neomicina, HCMV inmediata del promotor temprano, la región constante humana genómica kappa, una secuencia de péptido de señal de inmunoglobulina de ratón, secuencia Kozak, un intrón de secuencia de señal, terminador de transcripción BGH poliA, un marcador de selección Neo/G418, un marcador de selección de hámster dhfr.

10 **[0040]** El vector puede comprender además al menos una secuencia que codifica un componente seleccionado del grupo que consiste de: los genes de resistencia, promotor, péptido de señal, terminador de la transcripción poliA, marcadores de selección, la región constante de Ig humana genómica.

15 **[0041]** Los componentes del vector pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en: gen de resistencia a ampicilina, gen de resistencia a neomicina, promotor temprano inmediato de HCMV, la región constante genómica humana IgG1, una secuencia de péptido de señal de inmunoglobulina de ratón, secuencia Kozak, un intrón de secuencia de señal, terminador de transcripción BGH poliA, un marcador de selección Neo/G418, un marcador de selección de hámster dhfr.

20 **[0042]** Según otro aspecto, se proporcionan células huésped que contienen un vector que comprende la secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención o fragmentos del mismo para fines de almacenamiento, propagación, producción de anticuerpos y aplicaciones terapéuticas.

25 **[0043]** La célula huésped puede ser seleccionada de entre el grupo que consiste en: CHO, CHOdhfr, NSO, NSO/GS, COS, COS7.

#### Definiciones

30 **[0044]** El término "anticuerpos modificados", "anticuerpos mutados" y expresiones gramaticales similares se refieren a una alteración en una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por sustitución o delección o modificación química de uno o más residuos de aminoácidos, en comparación con la secuencia de los anticuerpos monoclonales humanizados originales BAT-1 inmunoglobulina.

35 **[0045]** "Anticuerpos monoclonales humanizados HBAT-1" se refiere a un número de anticuerpos monoclonales humanizados, basados en BAT murino (MBAT-1), descrito en la Patente de Estados Unidos N° 7.332.582. Los mAbs de hBAT-1 comprenden una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 (denotado BATRK<sub>D</sub>, BATRK<sub>A</sub>, BATRK<sub>B</sub> y BATRK<sub>C</sub>, respectivamente) y una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8 y 9 (denotada BATRH<sub>C</sub>, BATRH<sub>A</sub>, BATRH<sub>B</sub>, BATRH<sub>D</sub> y BATRH<sub>E</sub>, respectivamente). La secuencia de aminoácidos de las variantes de anticuerpo de cadena ligera y pesada (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) se representa en la Tabla 1. Los restos que difieren en dichas regiones variables son representados con un fondo gris (posiciones 2, 30, 69, 77, 97 y 98 de la región clara y posiciones 35, 69, 70 y 71 de la cadena pesada). Las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos de BAT murina (mBAT-1) se describen en la Patente de Estados Unidos N° 7.695.715. Las combinaciones particulares de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera del anticuerpo hBAT-1 se seleccionan del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 6/SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 8/SEQ ID NO: 3; y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 1. Los anticuerpos mutados se basan en las combinaciones particulares anteriores de regiones variables de cadena pesada y ligera y comprenden al menos una modificación específica de sitio tal como la sustitución seleccionada entre los aminoácidos descritos.

50 **[0046]** Una "modificación de aminoácido" como se utiliza aquí se refiere a una alteración en el ácido amino, por ejemplo, por sustitución o delección o modificación química de dicho aminoácido. Además, los anticuerpos de la invención pueden modificarse químicamente en uno o más residuos de aminoácidos, ya sea mediante procesos naturales, tales como procesamiento u otras modificaciones postraduccionales, o mediante técnicas de modificación química. Las modificaciones químicas incluyen, sin limitación, acetilación, acilación, amidación, ADP-ribosilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, unión covalente de un líquido o derivado lipídico, metilación, miristilación, pegilación, prenilación, fosforilación, ubiquitinación o cualquier proceso similar.

60 **[0047]** El término "aminoácido" se usa en su sentido más amplio para incluir aminoácidos naturales así como no aminoácidos de origen natural incluyendo análogos de aminoácidos. En vista de esta amplia definición, un experto en la técnica sabrá que la referencia en este documento a un aminoácido incluye, por ejemplo, (L)-aminoácidos, (D)-aminoácidos proteogénicos de origen natural, aminoácidos modificados químicamente tales como aminoácidos análogos, aminoácidos no proteogénicos de origen natural tales como norleucina, y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica como características de un aminoácido. Como se usa en el presente documento, el término "proteogénico" indica que el aminoácido se puede incorporar a una proteína en una célula a través de una ruta metabólica. Los aminoácidos usados en esta invención son aquellos que están

disponibles comercialmente o están disponibles por métodos sintéticos de rutina. Ciertos residuos pueden requerir métodos especiales para la incorporación en el péptido, y los enfoques sintéticos convergentes, divergentes y secuenciales a la secuencia peptídica son útiles en esta invención. Cuando no hay indicación, se pueden usar los isómeros L o D.

5  
[0048] Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen la sustitución de un aminoácido por otro que tenga el mismo tipo de grupo funcional o de la cadena lateral por ejemplo, alifático, aromático, cargado positivamente, cargado negativamente. Un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales al péptido, polipéptido o secuencia proteica que altera, agrega o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante conservativamente modificada" donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica.

10  
[0049] Los seis grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 15
- 1) Alanina (Ala; A), serina (Ser; S), treonina (Thr; T);
  - 2) Ácido aspártico (Asp; D), ácido glutámico (Glu; E);
  - 20 3) Asparagina (Asn; N), glutamina (Gln; Q);
  - 4) Arginina (Arg; R), histidina (His; H), lisina (Lys; K);
  - 5) Isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), metionina (Met; M), valina (Val; V); y
  - 25 6) Fenilalanina (Phe; F), tirosina (Tyr; Y), triptófano (Trp; W).

[0050] Como se usa en este documento, una "sustitución no conservativa" es cualquier sustitución de aminoácido distinta de una sustitución conservativa descrita anteriormente. Los ejemplos no limitantes para sustituciones no conservativas incluyen la sustitución de fenilalanina o triptófano por alanina, leucina o valina.

[0051] El término "anticuerpo" (también denominado "inmunoglobulina") se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa) y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada. Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la unión a antígeno o región variable de la misma. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0052] La unidad básica de la estructura del anticuerpo de origen natural es un complejo heterotetramérico de glicoproteína de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas, unidas entre sí por ambas asociaciones no covalentes y mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Existen cinco clases de anticuerpos humanos (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), y dentro de estas clases, varias subclases, se reconocen sobre la base de diferencias estructurales, como el número de unidades de inmunoglobulina en una sola molécula de anticuerpo, la estructura de puente de disulfuro de las unidades individuales, y diferencias en la longitud y secuencia de la cadena. La clase y subclase de un anticuerpo es su isotipo.

[0053] Las regiones terminales amino de las cadenas pesadas y ligeras son más diversas en la secuencia de las regiones carboxi terminales, y por lo tanto se denominan los dominios variables. Esta parte de la estructura del anticuerpo confiere la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Un dominio variable pesado (VH) y un dominio variable ligero (VL) juntos forman un solo sitio de unión a antígeno, por lo tanto, la unidad de inmunoglobulina básica tiene dos sitios de unión a antígeno. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Chothia y col., J. Mol. Biol. 186, 651-63 (1985); Novotny y Haber, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 4592 - 4596).

[0054] La porción carboxi terminal de las cadenas pesadas y ligeras forman los dominios constantes, es decir, CH1, CH2, CH3, CL. Si bien hay mucha menos diversidad en estos dominios, existen diferencias de una especie animal a otra, y además, dentro del mismo individuo hay varios isotipos diferentes de anticuerpos, cada uno con una función diferente.

[0055] El término "región estructural" o "FR" se refiere a los residuos de aminoácidos en el dominio variable de un anticuerpo que son diferentes de los residuos aminoácidos de la región hipervariable tal como se definen aquí. El término "región hipervariable" como se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos en el dominio variable de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR". Las CDR son

principalmente responsables de unirse a un epítopo de un antígeno. La extensión de FR y CDR ha sido definida con precisión (véase, Kabat et al., Ibid).

5 **[0056]** El término "inmunoglobulina humana aceptora" se refiere a la inmunoglobulina humana que proporciona el marco para un anticuerpo humanizado.

10 **[0057]** Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende una región marco de un anticuerpo humano y una o más CDR de una inmunoglobulina no-humana (por lo general un ratón o una rata). Las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales. Sin embargo, en algunos casos, los residuos de aminoácidos específicos, por ejemplo en las regiones estructurales, pueden modificarse para optimizar el rendimiento del anticuerpo humanizado. De manera importante, se espera que el anticuerpo humanizado se una al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. Para más detalles, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.225.539 asignado al Medical Research Council, Reino Unido.

15 **[0058]** Los términos "una región marco de una inmunoglobulina humana aceptora" y "una región marco derivada de una inmunoglobulina humana aceptora", y expresiones gramaticales similares se utilizan intercambiamente aquí para referirse a una región marco o parte de la misma que tiene la misma secuencia de aminoácidos de la inmunoglobulina aceptora humana.

20 **[0059]** El término 'anticuerpo humano' se refiere a un anticuerpo codificado por un gen que realmente está presente en un ser humano, o un alelo, variante o mutante del mismo.

25 **[0060]** El anticuerpo monoclonal humanizado modificado de la invención se genera preferiblemente mediante tecnología de ADN recombinante, utilizando injerto de CDR.

30 **[0061]** El término "mamífero" significa cualquier mamífero, incluyendo animales de compañía, tales como perros y gatos; animales de granja, tales como cerdos, ganado, ovejas y cabras; animales de laboratorio, tales como ratones y ratas; primates, como monos, simios y chimpancés; y preferiblemente, humanos.

#### Métodos de la invención

35 **[0062]** Inmunoterapéuticos de cáncer están dirigidos en general a la modulación de la respuesta del sistema inmune para inducir o potenciar la destrucción de las células tumorales y controlar el crecimiento del tumor. Este enfoque utiliza varios inmunomoduladores que incluyen anticuerpos monoclonales que se unen selectivamente a determinantes específicos en las células T, iniciando así una vía de activación o induciendo un efecto inhibitorio.

40 **[0063]** También descrito, pero sin formar parte de la presente invención es un método para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad o un trastorno, en particular cáncer, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo como ingrediente activo.

45 **[0064]** Todos los tipos de tumores se pueden tratar mediante los métodos divulgados. Los tumores pueden ser sólidos o no sólidos.

50 **[0065]** Algunos ejemplos de tumores sólidos que se pueden tratar con la combinación de la presente invención incluyen carcinomas, sarcomas, blastomas o gliomas. Algunos ejemplos de tales tumores incluyen tumores epidermoides, tumores escamosos, como tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores pulmonares, incluidos tumores de células pequeñas y de pulmón no microcítico, tumores pancreáticos, tumores tiroideos, tumores ováricos, tumores hepáticos, tumores esofágicos y tumores gástricos. Otros ejemplos incluyen sarcoma de Kaposi, neoplasmas del SNC, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales, melanoma, carcinomas y sarcomas gastrointestinales y renales, rhabdomyosarcoma, glioblastoma, preferiblemente glioblastoma multiforme y leiomyosarcoma. Los ejemplos de cánceres de piel vascularizados incluyen carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales y cánceres de piel que pueden tratarse suprimiendo el crecimiento de queratinocitos malignos, tales como queratinocitos malignos humanos.

60 **[0066]** Algunos ejemplos de tumores no sólidos incluyen leucemias, mielomas múltiples y linfomas. Algunos ejemplos de leucemias incluyen la leucemia mielocítica aguda (LMA), la leucemia mielocítica crónica (LMC), la leucemia linfocítica aguda (LLA), la leucemia linfocítica crónica (LLC), la leucemia eritrocítica o la leucemia monocítica. Algunos ejemplos de linfomas incluyen linfomas asociados con la enfermedad de Hodgkin, la enfermedad no Hodgkin o el linfoma de células del manto.

65 **[0067]** Los tipos de tumores actualmente preferidos se seleccionan del siguiente grupo: carcinoma colorrectal; carcinoma de pulmón que incluye cáncer de pulmón no pequeño (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC); carcinoma de mama; melanoma; carcinoma de ovario; carcinoma de cuello uterino, cáncer de páncreas;

5 carcinoma de cabeza y cuello; carcinoma gastrointestinal; tumores esofágicos; carcinoma hepatocelular; mieloma múltiple; carcinoma de células renales; tumores de próstata; linfoma no Hodgkin; enfermedad de Hodgkin; linfoma de células del manto; sarcoma de Kaposi; carcinoma de células escamosas; carcinoma de células basales; leucemia mieloide aguda (AML); leucemia mielocítica crónica (LMC); leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia linfocítica crónica (LLC).

10 **[0068]** El término "efecto antitumoral" como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto biológico beneficioso, que se puede manifestar por uno cualquiera o más de: una disminución o estabilización de volumen del tumor, una disminución o estabilización del número de células tumorales, una disminución o estabilización de la tasa de crecimiento tumoral, disminución o estabilización del número de metástasis, protección contra la recurrencia tumoral, aumento de la esperanza de vida o supervivencia del sujeto con el tumor, aumento de la esperanza de vida o supervivencia sin progresión de la enfermedad del sujeto con el tumor o la mejora de varios síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa. Un "efecto antitumoral" también se puede manifestar por la capacidad de prevenir la aparición de un tumor en primer lugar o la recurrencia del tumor. Dadas sus propiedades, los métodos divulgados se pueden usar en el tratamiento de cáncer agudo, de cáncer latente, controlado o estabilizado, así como en la profilaxis del cáncer.

20 **[0069]** El término "supervivencia mejorada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un período de tiempo prolongado durante el cual el sujeto o paciente está vivo después del tratamiento con un método descrito en este documento. La supervivencia mejorada denota la mayor probabilidad de mantenerse libre de progresión de la enfermedad para un individuo que padece cáncer después de un tratamiento particular. También se usa para describir el elevado porcentaje de individuos en un grupo cuya enfermedad probablemente se mantenga estable (sin mostrar signos de progresión) después de un período específico de tiempo, en comparación con un grupo de control. También se usa para describir el porcentaje elevado de individuos en un grupo cuya enfermedad probablemente se cure (sin mostrar signos de enfermedad) después de un período específico de tiempo, en comparación con un grupo de control. Este parámetro puede medirse por cualquiera de los puntos finales clínicos habituales indicados como "supervivencia libre de progresión", "supervivencia global" y "supervivencia libre de enfermedad" utilizados como una indicación de la eficacia de un tratamiento particular.

30 **[0070]** El término "recurrencia del tumor" se refiere a la re-emergencia, reaparición, re-crecimiento o la proliferación de un tumor del mismo tipo, ya sea en la misma ubicación o en una ubicación diferente, después de un período durante el cual el crecimiento del tumor original se ha revertido, detenido o inhibido.

35 **[0071]** El término "mejora o aumenta la supervivencia de los linfocitos" tal como se utiliza aquí se refiere a la capacidad de los anticuerpos de la invención para prolongar la viabilidad de los linfocitos in vitro o in vivo, en comparación con la viabilidad de una población de células idénticas no en contacto con el anticuerpo de la invención. Con respecto a la terapia de combinación, el término se refiere a la capacidad de una combinación particular de tratamientos para prolongar la viabilidad de linfocitos in vitro o in vivo, en comparación con la viabilidad de una población celular idéntica con solo uno de los tratamientos.

40 **[0072]** Una actividad antitumoral similar a MBAT-1 o HBAT-1 se refiere a un efecto antitumoral de alrededor de 5%, o no más de 10%, similar al efecto antitumoral de MBAT-1 o HBAT-1. Una actividad antitumoral mayor que mBAT-1 o hBAT-1 se refiere a una actividad antitumoral de más del 10%, más del 30% o más del 30%, en comparación con la actividad antitumoral mayor que mBAT-1 o hBAT-1 .

45 **[0073]** El anticuerpo de la invención puede administrarse junto con, antes de, o después de la administración de otros agentes, que pueden actuar de una forma aditiva o sinérgica con él.

50 **[0074]** El anticuerpo de la invención puede administrarse junto con, antes de, o después de la administración de agentes seleccionados del grupo que consiste en: citocinas, IL-1 (interleuquina-1), IL-2, IL-6, IFN- $\alpha$  (Interferón-a), vacunas celulares, anticuerpos, anticuerpos n-estimuladores de células T, anticuerpos terapéuticos antitumorales.

55 **[0075]** La enfermedad o el trastorno a ser tratado con la invención es una enfermedad relacionada con inmunodeficiencia o trastorno seleccionado de enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, y cualquier trastorno que implica el agotamiento, la atenuación y/o mal funcionamiento de los linfocitos, específicamente células T, células NK, células NK-T, células B, monocitos, macrófagos o cualquier combinación de los mismos.

60 **[0076]** La enfermedad o trastorno puede ser una inmunodeficiencia, mal funcionamiento inmunológico o incompetencia inmune, denominada colectivamente en lo sucesivo como trastornos de inmunodeficiencia, establecidos después de la quimioterapia o la irradiación. La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención se puede usar junto con el trasplante autólogo, alogénico o singénico de células madre derivado de la médula ósea, la sangre del cordón umbilical o la sangre periférica y la infusión de leucocitos del donante.

65 **[0077]** El trastorno de inmunodeficiencia puede ser seleccionado de entre el grupo que consiste en: enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, agammaglobulinemia ligada a X,

inmunodeficiencia variable común, la deficiencia de IgA, deficiencia de subclase IgG, síndrome de Wiskott-Aldrich, anomalía de DiGeorge, ataxia telangiectasia, deficiencia de desaminasa de adenosina y deficiencia de desaminasa de citidina inducida por la activación.

- 5 **[0078]** El trastorno de inmunodeficiencia puede estar relacionado con la infección viral, infección fúngica o infección bacteriana. El trastorno de inmunodeficiencia puede asociarse con la intoxicación.

Terapia de combinación con quimioterapia

- 10 **[0079]** La administración del anticuerpo humanizado inmunoestimulador puede comprender aminoácidos modificados junto con al menos un agente quimioterapéutico antitumoral que actúa para potenciar el efecto antitumoral de los agentes quimioterapéuticos, y viceversa. Las combinaciones del anticuerpo inmunoestimulador junto con al menos un agente quimioterapéutico pueden mejorar el resultado clínico de manera significativa frente a cada uno de los tratamientos solo. Existe sinergia cuando los tumores se tratan con el anticuerpo humanizado de la invención junto con al menos un agente quimioterapéutico y, opcionalmente, además junto con la radiación.

15 **[0080]** En otras palabras, el efecto antitumoral del anticuerpo humanizado de la invención se aumenta más de lo esperado cuando se combina con al menos un agente quimioterapéutico.

- 20 **[0081]** El efecto antitumoral inducido por las combinaciones de la invención incluye la prevención, la inhibición de la progresión de un tumor, la reducción del crecimiento tumoral y la protección contra la recurrencia tumoral, incluidos los tumores cancerosos y no cancerosos. La progresión de un tumor incluye la invasividad, metástasis, recurrencia y aumento en el tamaño del tumor. La reducción del crecimiento tumoral también incluye la destrucción o eliminación de un tumor que conduce a la remisión completa.

- 25 **[0082]** El anticuerpo de la invención puede ser eficaz para mejorar la tolerabilidad a los agentes quimioterapéuticos. Como es sabido en la técnica, un revés importante para los pacientes sometidos a quimioterapia contra el cáncer es la aparición de efectos secundarios adversos graves y perjudiciales debido a la potente toxicidad de la mayoría de los agentes quimioterapéuticos.

- 30 **[0083]** También descrito, pero sin formar parte de la invención es un método para mejorar la supervivencia en un sujeto con un tumor, que comprende la administración del anticuerpo humanizado de la invención, ya sea por su propia cuenta, u opcionalmente, en combinación con la administración adicional de uno o más agentes quimioterapéuticos.

- 35 **[0084]** También descrito, pero sin formar parte de la invención es un método para reducir o prevenir la recurrencia de un tumor, que comprende la administración del anticuerpo humanizado de la invención, ya sea por su propia cuenta, u opcionalmente, en combinación con la administración adicional de uno o más agentes quimioterapéuticos. El tratamiento de combinación de animales de experimentación usando el anticuerpo humanizado de la invención y agentes quimioterapéuticos indujo un efecto de "memoria", de modo que la recurrencia del tumor se inhibe al volver a estimular con el tipo de tumor original.

- 40 **[0085]** El término "tolerancia a los agentes quimioterapéuticos" se refiere a la capacidad fisiológica, fisicoquímica y inmunológica de un sujeto a tolerar los efectos secundarios adversos asociados con el tratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos. De acuerdo con esto, el término "mejora de la tolerabilidad a agentes quimioterapéuticos" se refiere a aumentar la capacidad fisiológica y fisicoquímica de dichos efectos secundarios adversos, de manera que se disminuye la gravedad de los efectos secundarios adversos y/o se disminuye el número de efectos secundarios. Por consiguiente, "mejorar la tolerabilidad de los agentes quimioterapéuticos" puede referirse a la mejora de la calidad de vida de los pacientes con cáncer tratados con agentes quimioterapéuticos.

- 50 **[0086]** La administración del anticuerpo de la invención y del al menos un agente quimioterapéutico puede ser llevada a cabo de forma sustancialmente simultánea, al mismo tiempo, alternativamente, de forma secuencial o sucesivamente. El anticuerpo y el al menos un agente quimioterapéutico se pueden administrar de acuerdo con programas superpuestos.

- 55 **[0087]** La administración del anticuerpo se puede llevar a cabo antes de la administración inicial del al menos un agente quimioterapéutico.

- 60 **[0088]** La administración de uno o ambos anticuerpos y el al menos un agente quimioterapéutico se puede llevar a cabo mediante una ruta seleccionada del grupo que consiste en perfusión intravenosa, oral, intraperitoneal, subcutánea, de miembro aislado, infusión en un órgano y combinaciones de los mismos.

- 65 **[0089]** Cabe señalar que, según la enseñanza de la presente invención, el anticuerpo humanizado modificado de la invención puede administrarse antes, durante o después de comenzar la quimioterapia y, opcionalmente, terapia de radiación, así como cualquier combinación de los mismos, es decir, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después de comenzar la quimioterapia y, opcionalmente, la radioterapia. Por ejemplo, el

anticuerpo de la invención se puede administrar entre 1 y 30 días antes o después de comenzar la quimioterapia. El anticuerpo puede administrarse adicionalmente entre ciclos de quimioterapia.

5 **[0090]** En los métodos de la terapia de combinación descritos en este documento, los anticuerpos se pueden administrar en paralelo a la quimioterapia, por ejemplo sustancialmente de forma simultánea o concurrente. También se pueden usar otros programas de administración, por ejemplo, programas solapados o aquellos que implican administrar los dos tipos de tratamiento de forma alternativa, o sucesiva.

10 **[0091]** El al menos un agente quimioterapéutico puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en: antimetabolitos, fármacos basados en platino, inhibidores mitóticos, antibióticos de antraciclina, inhibidores de topoisomerasa, agentes anti-angiogénicos y combinaciones de los mismos.

15 **[0092]** El al menos un agente quimioterapéutico puede seleccionarse de modo que el HBA-1 de la invención modificada aumenta la supervivencia de los linfocitos cuando se utiliza en combinación con el agente quimioterapéutico. Típicamente, la supervivencia potenciada o aumentada se puede ensayar convenientemente in vitro.

20 **[0093]** Por consiguiente, el agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un antimetabolito, tal como el análogo de pirimidina 5-fluorouracilo, o citarabina, o un fármaco basado en platino, tal como oxaliplatino o cisplatino. Además, el agente quimioterapéutico puede ser distinto de un agente seleccionado de un inhibidor de topoisomerasa I (tal como SN-38) y un agente alquilante (tal como ciclofosfamida).

25 **[0094]** El al menos un agente quimioterapéutico puede ser un antimetabolito, incluyendo antagonistas de purinas, antagonistas de pirimidina y antagonistas de folato. El antimetabolito puede ser un antagonista de la pirimidina. El antimetabolito puede seleccionarse del grupo que consiste en: 5-fluorouracilo, mostaza de uracilo, uracilo, capecitabina, 6-mercaptopurina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, fludarabina y pemetrexed.

30 **[0095]** El al menos un agente quimioterapéutico puede ser 5-fluorouracilo, citarabina, un medicamento a base de platino seleccionado del grupo que consiste en: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, un inhibidor mitótico seleccionado del grupo que consiste en: paclitaxel, docetaxel, etopósido, vinblastina, vincristina y vinorelbina, un antibiótico de antraciclina seleccionado del grupo que consiste en: daunorrubicina, respinomicina D e idarrubicina, un agente antiangiogénico seleccionado del grupo que consiste en: bevacizumab, dopamina, tetratiomolibdato y variantes antiangiogénicas de VEGF, además de un inhibidor de topoisomerasa I, o además de un agente alquilante.

35 **[0096]** Los fármacos de quimioterapia se dividen en varios grupos en función de su efecto sobre las células cancerosas, las actividades celulares o procesos con los que el fármaco interfiere, o las fases específicas del ciclo celular a las que afecta la droga. Por consiguiente, los fármacos de quimioterapia se clasifican en una de las siguientes categorías: agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antraciclinas, inhibidores de la topoisomerasa I y II, inhibidores mitóticos, *entre otros*, medicamentos a base de platino, esteroides y agentes antiangiogénicos.

40 **[0097]** Los antimetabolitos, también denominados "análogos de nucleósidos", reemplazan sustancias naturales como bloques de construcción en moléculas de ADN, alterando así la función de las enzimas requeridas para el metabolismo celular y la síntesis de proteínas. En el caso de que imiten los nutrientes requeridos para el crecimiento celular, las células finalmente se someten a lisis. Si un nucleósido se reemplaza con un análogo de nucleósido no funcional, este último se incorpora al ADN y ARN, induciendo finalmente el paro del ciclo celular y la apoptosis al inhibir la capacidad de la célula de sintetizar ADN. Los antimetabolitos son específicos del ciclo celular y son más efectivos durante la fase S de la división celular, ya que actúan principalmente sobre las células que experimentan la síntesis de nuevo ADN para la formación de nuevas células. Las toxicidades asociadas con estos medicamentos se observan en células que crecen y se dividen rápidamente. Los ejemplos de antimetabolitos incluyen antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina y antagonistas de folato. Estos agentes dañan las células durante la fase S y se usan comúnmente para tratar las leucemias, los tumores de mama, los ovarios y el tracto gastrointestinal, así como otros cánceres. Los ejemplos específicos de antimetabolitos incluyen 5-fluorouracilo (también conocido como 5FU), capecitabina, 6-mercaptopurina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, fludarabina y pemetrexed.

55 **[0098]** Los fármacos quimioterapéuticos a base de platino reticulan ADN de varias maneras diferentes, interfiriendo con la división celular por mitosis. El ADN dañado provoca mecanismos de reparación del ADN, que a su vez activan la apoptosis cuando la reparación resulta imposible. Lo más notable entre los cambios de ADN son los enlaces cruzados de 1,2-intrahebra con las bases de purina. Estos incluyen aductos de 1,2-intrahebra d(GpG) que forman casi el 90% de los aductos y los aductos de 1,2-intrahebra d(ApG) menos comunes. Se producen aductos de 1,3-intrahebra d(GpXpG) pero se escinden fácilmente mediante la reparación por escisión de nucleótidos (NER). Otros aductos incluyen reticulaciones entre hebras y aductos no funcionales que se han postulado para contribuir a la actividad de los fármacos a base de platino. La interacción con las proteínas celulares, en particular las proteínas del dominio HMG, también se ha avanzado como un mecanismo para interferir con la mitosis, aunque éste probablemente no sea su método de acción principal. Los medicamentos quimioterapéuticos basados en platino incluyen cisplatino (también conocido como cisplatino o *cis*-diaminodichloridoplatino II (CDDP), carboplatino y

oxaliplatino. El cisplatino se designa con frecuencia como un agente alquilante, aunque no tiene grupo alquilo y no puede llevar a cabo reacciones de alquilación. Se clasifica correctamente como similar a alquilante. Drogas quimioterapéuticas basadas en platino se utilizan para tratar varios tipos de cánceres, incluyendo sarcomas, algunos carcinomas (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, y cáncer de ovario), linfomas y tumores de células germinales.

**[0099]** Inhibidores mitóticos interfieren con la división celular. El agente quimioterapéutico más conocido en esta categoría es paclitaxel (también conocido como Taxol®, "alcaloide de la planta", "taxano" y un "agente antimicrotúbulo"). Junto con docetaxel, forma la categoría de los taxanos., se conocen otros inhibidores mitóticos, que incluyen, pero no se limitan a, etopósido, vinblastina y vincristina. El paclitaxel actúa al interferir con el crecimiento normal de los microtúbulos durante la división celular al detener su función; hiper-estabiliza su estructura. Esto destruye la capacidad de la célula para usar su citoesqueleto de manera flexible. Específicamente, paclitaxel se une a la subunidad  $\beta$  de tubulina, el "bloque de construcción" de microtúbulos, y la unión de paclitaxel bloquea estos bloques de construcción en su lugar. El complejo de microtúbulos/paclitaxel resultante no tiene la capacidad de desmontarse. Esto afecta negativamente a la función celular porque el acortamiento y alargamiento de los microtúbulos (denominado inestabilidad dinámica) es necesario para su función como mecanismo para transportar otros componentes celulares. Por ejemplo, durante la mitosis, los microtúbulos posicionan los cromosomas a través de su replicación y posterior separación en los dos núcleos de células hijas. Además, el paclitaxel induce la muerte celular programada (apoptosis) en células cancerosas uniéndose a la apoptosis que detiene la proteína Bcl-2 (leucemia de células B 2) y deteniendo así su función.

**[0100]** Otro grupo de medicamentos que interactúan con ADN ampliamente utilizados en la quimioterapia contra el cáncer es el grupo de antibióticos de antraciclina que incluye, entre otras cosas, daunorrubicina, doxorrubicina (también conocida como Adriamycin® y hidrocloreuro de doxorrubicina), respinomicina D e idarrubicina. Estos fármacos interactúan con el ADN mediante la intercalación y la inhibición de la biosíntesis macromolecular inhibiendo así la progresión de la enzima de topoisomerasa II, que desenrolla el ADN para la transcripción. Estabilizan el complejo de topoisomerasa II después de haberse roto la cadena de ADN para la replicación, evitando que la doble hélice de ADN se vuelva a sellar y deteniendo por lo tanto el proceso de replicación. Se usa comúnmente en el tratamiento de una amplia variedad de cánceres.

**[0101]** Los agentes antineoplásicos alquilantes atacan directamente al ADN. Unen un grupo alquilo al ADN, reticulando nucleobases de guanina en cadenas de ADN de doble hélice. Esto hace que los filamentos no puedan desenrollarse y separarse. Como esto es necesario en la replicación del ADN, las células ya no pueden dividirse. Estas drogas actúan de manera no específica. La ciclofosfamida es un agente alquilante, sin embargo, es una sustancia inmunosupresora altamente potente.

**[0102]** Los inhibidores de topoisomerasa I y II interfieren con la actividad enzimática de la topoisomerasa I y 2, respectivamente, lo que finalmente conduce a la inhibición tanto de la replicación como de la transcripción del ADN. Los ejemplos de inhibidores de topoisomerasa I incluyen topotecan e irinotecan. El irinotecán es un profármaco convertido en un metabolito biológicamente activo 7-etilo-10-hidroxi-campotecina (SN-38) por una enzima convertidora de carboxilesterasa. Milésimamente más potente que su compuesto original irinotecán, SN-38 inhibe la actividad de la topoisomerasa I estabilizando el complejo escindible entre la topoisomerasa I y el ADN, lo que produce rupturas de ADN que inhiben la replicación del ADN y desencadenan la muerte celular apoptótica. Debido a que la síntesis de ADN en curso es necesaria para que el irinotecán ejerza sus efectos citotóxicos, también se clasifica como un agente específico de la fase S. Los ejemplos de inhibidores de topoisomerasa II incluyen etopósido y tenipósido.

**[0103]** Los agentes antiangiogénicos interfieren con la generación de nuevos vasos sanguíneos, lo que finalmente conduce a la "inanición" de los tumores. Los ejemplos no limitantes de agentes anti-angiogénicos incluyen el anticuerpo monoclonal bevacizumab, dopamina y tetratiomolibdato.

**[0104]** El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es una glucoproteína dimérica 32-42 kDa que media la vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y la mitogénesis de células endoteliales. El corte y empalme del exón diferencial del gen VEGF da como resultado tres especies principales de ARNm que codifican tres isoformas secretadas (los subíndices denotan el número de aminoácidos): VEGF189, VEGF165 y VEGF121. También se han descrito varias variantes menores de empalme (VEGF206, VEGF183, VEGF145 y VEGF148). Las variantes de los polipéptidos de VEGF y su uso en la terapia del cáncer se describen, por ejemplo, en el documento WO/2003/012105.

#### Terapia de combinación con radiación

**[0105]** La fuente de radiación que puede usarse en combinación con el anticuerpo modificado de la invención y el agente quimioterapéutico puede ser externo o interno para el paciente que se está tratando. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como radioterapia de haz externo (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna para el paciente, el tratamiento se llama braquiterapia (BT).



**[0106]** La radiación se administra de acuerdo con técnicas estándar bien conocidas usando equipos estándar fabricados para este fin, tal como AECL Theratron y Varian Clinac.

5 **[0107]** La distancia entre la fuente de la radiación externa y el punto de entrada en el paciente puede ser cualquier distancia que representa un equilibrio aceptable entre matar células diana y minimizar los efectos secundarios. Típicamente, la fuente de la radiación externa está entre 70 y 100 cm desde el punto de entrada al paciente.

10 **[0108]** La braquiterapia generalmente se lleva a cabo colocando la fuente de radiación en el paciente. Típicamente, la fuente de radiación se coloca aproximadamente a 0-3 cm del tejido que se está tratando. Las técnicas conocidas incluyen braquiterapia intersticial, intercavitaria y de superficie. Las semillas radiactivas se pueden implantar de forma permanente o temporal. Algunos átomos radiactivos típicos que se han utilizado en implantes permanentes incluyen yodo-125 y radón. Algunos átomos radiactivos típicos que se han utilizado en implantes temporales incluyen radio, cesio-137 e iridio-192. Algunos átomos radiactivos adicionales que se han usado en la braquiterapia incluyen americio-241 y oro-198.

15 **[0109]** La dosis de radiación depende de numerosos factores, como es bien conocido en la técnica. Dichos factores incluyen el órgano que se está tratando, los órganos sanos en el camino de la radiación que podrían verse afectados inadvertidamente, la tolerancia del paciente a la radioterapia y el área del cuerpo que necesita tratamiento. La dosis generalmente estará entre 1 y 100 Gy, y más particularmente entre 2 y 80 Gy. Algunas dosis que se han informado incluyen 35 Gy en la médula espinal, 15 Gy en los riñones, 20 Gy en el hígado y 65-80 Gy en la próstata. Sin embargo, se debe enfatizar que la invención no está limitada a ninguna dosis particular. La dosis será determinada por el médico tratante de acuerdo con los factores particulares en una situación dada, incluidos los factores mencionados anteriormente.

20 **[0110]** La dosis de radiación para braquiterapia puede ser la misma que la mencionada anteriormente para radioterapia de haz externo. Además de los factores mencionados anteriormente para determinar la dosis de radioterapia de haz externo, también se tiene en cuenta la naturaleza del átomo radiactivo utilizado para determinar la dosis de braquiterapia.

25 **[0110]** Anticuerpo humanizado de la invención

30 **[0111]** Como se usa en el presente documento, los términos "BAT" y un anticuerpo BAT" se usan en un sentido amplio y cubre específicamente anticuerpos idénticos a, o basados en el anticuerpo monoclonal murino conocido como MBAT-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo monoclonal mBAT-1 es secretado por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), bajo el Número de Acceso 1-1397, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.897.862. Además, "BAT" y un anticuerpo BAT "puede referirse a un anticuerpo, que reconoce el mismo epítipo antigénico que mBAT-1, por ejemplo un anticuerpo quimérico como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0026800. Un anticuerpo BAT también incluye un anticuerpo humanizado, varios ejemplos del cual se describen en el documento WO03/099196 y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2008/0025980 y denominados indistintamente "CT-011", "hBAT" y "hBAT-1".

35 **[0112]** En general, la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humanizado se caracteriza por la fórmula:

40 
$$FR_{L1}-CDR_{L1}-FR_{L2}-CDR_{L2}-FR_{L3}-CDR_{L3}-FR_{L4}$$

45 en donde cada FR es independientemente una región estructural de un anticuerpo humano y cada CDR es independientemente una región determinante de complementariedad del anticuerpo monoclonal mBAT-1.

50 **[0113]** En general, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humanizado se caracteriza por la fórmula:

$$FR_{H1}-CDR_{H1}-FR_{H2}-CDR_{H2}-FR_{H3}-CDR_{H3}-FR_{H4}$$

55 en donde cada FR es independientemente una región estructural de un anticuerpo humano y cada CDR es independientemente una región determinante de complementariedad del anticuerpo monoclonal mBAT-1.

60 **[0114]** Las FR pueden derivarse de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo TEL9 humano, o se modifican a partir de ellas en ciertos residuos de aminoácidos. El anticuerpo humano TEL-9 se identificó en diversas bibliotecas de genes variables (V) de cadena pesada (VH) y ligera (V kappa y V lambda) de inmunoglobulina preparadas a partir de linfocitos de sangre periférica de donantes no inmunizados (Marks y col., J Mol Biol. 1991, 222: 581-97). Se demostró que este anticuerpo se une específicamente al antígeno de la lisozima blanca de huevo de pavo (TEL).

65 **[0115]** Las FR se pueden derivar de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo hsigv1295 humano, o se modifican del mismo en ciertos residuos de aminoácidos. El anticuerpo hsigv1295 humano se aisló de hibridomas

estables y líneas celulares B transformadas con virus de Epstein-Barr del líquido sinovial o sangre periférica de tres pacientes con artritis reumatoide y un paciente con lupus eritematoso sistémico (Fang y col., J Exp Med. 1994, 179: 1445-56).

## 5 Composiciones, administración y dosificaciones

**[0116]** Para su uso en los métodos descritos, el anticuerpo humanizado se puede formular de una manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, estabilizadores o excipientes (vehículos) para formar una composición farmacéutica como se conoce en la técnica, en particular con respecto a los agentes activos proteicos. El (los) portador(es) son "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Los vehículos adecuados típicamente incluyen solución salina fisiológica o polioles de etanol tales como glicerol o propilenglicol.

**[0117]** El anticuerpo puede formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico y maleico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como hidróxido sódico, potásico, amónico, cálcico o férrico, y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina y procaína.

**[0118]** Las composiciones se pueden formular adecuadamente para administración intramuscular, intravenosa, subcutánea, o intraperitoneal y convenientemente comprenden soluciones acuosas estériles del anticuerpo, que son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor. Dichas formulaciones se preparan típicamente disolviendo el ingrediente activo sólido en agua que contiene sustancias fisiológicamente compatibles tales como cloruro de sodio, glicina, y que tiene un pH tamponado compatible con las condiciones fisiológicas para producir una solución acuosa, y hacer que dicha solución sea estéril. Pueden prepararse en recipientes unitarios o multidosis, por ejemplo, ampollas o viales sellados.

**[0119]** Las composiciones pueden incorporar un estabilizador, tal como por ejemplo polietilenglicol, proteínas, sacáridos (por ejemplo trehalosa), aminoácidos, ácidos inorgánicos y mezclas de los mismos. Los estabilizantes se usan en soluciones acuosas a la concentración y el pH apropiados. El pH de la solución acuosa se ajusta para estar dentro del intervalo de 5,0-9,0, preferiblemente dentro del intervalo de 6-8. Al formular el anticuerpo, se puede usar un agente anti adsorción. Otros excipientes adecuados pueden incluir típicamente un antioxidante tal como ácido ascórbico.

**[0120]** Las composiciones se pueden formular como preparaciones de liberación controlada que se pueden lograr mediante el uso de polímero para formar complejos o absorber las proteínas. Los polímeros apropiados para formulaciones de liberación controlada incluyen, por ejemplo, poliéster, poliaminoácidos, polivinilo, pirrolidona, etilenoacetato y metilcelulosa. Otro posible método para la liberación controlada consiste en incorporar el anticuerpo en partículas de un material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, ácido poli(láctico) o copolímeros de vinilacetato de etileno. Alternativamente, en lugar de incorporar estos agentes en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato). Respectivamente, o en sistemas de administración de fármacos coloidales, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones.

**[0121]** Cuando se desean preparaciones orales, las composiciones pueden combinarse con portadores, tales como lactosa, sacarosa, almidón, estearato de magnesio de talco, celulosa cristalina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, glicerina, alginato de sodio o goma árabe.

**[0122]** El anticuerpo humanizado de la invención se administra preferiblemente por vía parenteral, generalmente por infusión intravenosa. La administración también puede ser por vía intraperitoneal, oral, subcutánea o intramuscular. Los anticuerpos se administran generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg de peso del paciente, habitualmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/kg, y a menudo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg. A este respecto, se prefiere usar anticuerpos que tengan una vida media circulante de al menos 12 horas, preferiblemente al menos 4 días, más preferiblemente hasta 21 días. Se espera que los anticuerpos quiméricos y humanizados tengan semividas circulatorias de hasta cuatro y hasta 14-21 días, respectivamente. En algunos casos, puede ser ventajoso administrar una dosis de carga grande seguida de dosis de mantenimiento periódicas (p. ej., semanalmente) durante el período de tratamiento. Los anticuerpos también pueden administrarse mediante sistemas de administración de liberación lenta, bombas y otros sistemas de administración conocidos para infusión continua. Los regímenes de dosificación se pueden variar para proporcionar los niveles circulantes deseados de un anticuerpo particular en función de su farmacocinética. Por lo tanto, las dosis se calcularán de modo que se mantenga el nivel circulante deseado de agente terapéutico.

**[0123]** Típicamente, la dosis efectiva se determinará por la condición del sujeto, así como también por el peso

corporal o el área superficial del sujeto a tratar. El tamaño de la dosis y el régimen de dosificación también se determinarán por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de anticuerpos modificados de la invención en un sujeto particular. Para determinar la cantidad efectiva de la composición terapéutica a administrar, el médico necesita evaluar, entre otros, los niveles en plasma circulantes, la toxicidad y la progresión de la enfermedad.

**[0124]** El término "cantidad eficaz" con respecto al anticuerpo humanizado y el agente quimioterapéutico de la invención debe entenderse en el sentido de una cantidad de cada uno de estos agentes activos requeridos para lograr un efecto terapéutico, sin causar efectos secundarios adversos excesivos o incontrolables. La cantidad eficaz requerida para alcanzar el resultado terapéutico final puede depender de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, el tipo específico del tumor y la gravedad del estado del paciente, y si la combinación se coadministra adicionalmente con radiación. La cantidad (dosis) efectiva de los agentes activos, en el contexto de la presente invención debería ser suficiente para efectuar una respuesta terapéutica beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo, incluyendo la inhibición del crecimiento tumoral, la reducción en la tasa de crecimiento tumoral, prevención del crecimiento de tumores y metástasis y mayor supervivencia.

**[0125]** De acuerdo con las combinaciones descritas en este documento, el anticuerpo y el agente quimioterapéutico pueden administrarse según cualquiera de una serie de programas de tratamiento, también denominados "programas de dosificación" y "regímenes de administración", en referencia a la frecuencia de administración y el orden de administración de cada agente activo. Por ejemplo, el anticuerpo y el agente quimioterapéutico se pueden administrar de manera sustancialmente simultánea, es decir, al mismo tiempo, usando, por ejemplo, una forma de dosificación combinada o formas de dosificación separadas. Esta forma de administración también puede denominarse administración "concomitante". La administración concurrente se refiere a la administración de los agentes activos dentro del mismo período de tiempo general, por ejemplo el mismo día pero no necesariamente al mismo tiempo. Por ejemplo, un agente activo puede requerir administración con alimentos, mientras que el otro requiere administración en el estado semi-ayuno. La administración alternativa incluye la administración de un agente durante un período de tiempo particular, por ejemplo, en el transcurso de unos pocos días o una semana, seguido de la administración del otro agente durante un período idéntico subsiguiente, repitiendo a continuación la fórmula para uno o más ciclos. La administración sucesiva incluye la administración de un agente durante un primer período de tiempo, usando una o más dosis, seguido de la administración del otro agente durante un segundo período de tiempo usando una o más dosis. También se puede emplear un programa de solapamiento, que incluye la administración de los agentes activos en diferentes días durante el período de tratamiento, no necesariamente de acuerdo con una secuencia regular. Las variaciones en estas pautas generales también se pueden emplear, de acuerdo con los agentes utilizados y la condición del sujeto.

**[0126]** En algunas combinaciones particulares, puede ser ventajoso usar una secuencia específica de administración, por ejemplo, un agente antes que el otro.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

**[0127]** Viabilidad de los linfocitos T CD4+ después de la incubación con un doble mutante CT-011.

**[0128]** Un anticuerpo doble mutante CT-011 que comprende sustituciones de aminoácidos de Trp107 a Ala y Phe97 a Ala fue formado (denotado w222 + F97). El ejemplo representativo de linfocitos T CD4+ humanos activados por 48 horas incubados con 1ug/ml o 0,1ug/ml CT-011 o CT-011 doble mutante W222 + F97 o anticuerpos de control de isotipo durante 72 horas adicionales. La viabilidad celular se evaluó mediante exclusión con azul tripán.

**[0129]** Como se ve en la Figura 1, la viabilidad de los linfocitos es mayor en los cultivos que incluyen el anticuerpo doblemente mutante. El eje Y de la Figura 1 indica la concentración de células viables.

### EJEMPLO 2

Efecto in vivo del hBAT-1 modificado en un modelo de tumor murino

**[0130]** Para examinar si los anticuerpos modificados de la presente invención pueden transmitir los efectos biológicos característicos de MBAT-1 o HBAT-1, la eficacia de los anticuerpos modificados se estudió in vivo.

**[0131]** Se inocularon ratones C57BL con células de melanoma B16 para inducir metástasis pulmonares. Se inyectan cantidades crecientes (1, 10 y 20 mg) de un mAAb modificado de la invención el día 12 después de la inoculación del tumor y se comparan con una dosis óptima de 10 µg de mBAT-1 y/o hBAT-1. El peso del pulmón puede medirse el día 24 después de la inoculación del tumor para indicar el establecimiento de un tumor. El peso promedio de pulmón por tratamiento es indicativo de los diversos mAbs ensayados.

### EJEMPLO 3

Inhibición del melanoma humano (SK-28) en ratones SCID por el hBAT-1 modificado

[0132] BAT-1 mAb de ratón y humano han demostrado que inhiben la formación de metástasis de tumor humano en la presencia de linfocitos de sangre periférica humana (HPBL). Para estimar la eficacia de hBAT-1 modificado en la inhibición del cáncer humano, el anticuerpo modificado se estudia en un modelo que combina tumores y linfocitos de origen humano. Se injertan ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) con hPBL para restaurar la competencia inmune. Los ratones son desafiados con células de melanoma humano (SK-28) y tratados con concentraciones crecientes del anticuerpo humanizado, administrados en una única dosis iv el día 11 después de la inoculación del tumor.

#### EJEMPLO 4

Inmunoterapia de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal humano mediante el mAb de hBAT-1 modificado en ratones desnudos

[0133] LIM6 y HM7 son dos subclones de la línea de células de CRC humano LS174T que se seleccionaron por su alta síntesis de mucina y potencial metastásico. Las células tumorales se inyectan en el bazo expuesto de ratones desnudos anestesiados. Después de 1 minuto, los bazos se eliminan y las excisiones se cierran. Se administran dosis bajas de mBAT-1, hBAT-1 y anticuerpos hBAT-1 modificados de la invención 12 días después y los ratones se sacrifican 35 días después de la inoculación del tumor. Se pesan los hígados, se cuenta el número de nódulos metastásicos y se procesa el tejido hepático para estudio de histología e inmunohistoquímico.

#### EJEMPLO 5

Colocalización del hBAT modificado con CD4 y CD8

[0134] Se ha demostrado que BAT-1 de ratón y humano se unen los linfocitos humanos, reconociendo subconjuntos tanto CD4+ como CD8+. Para establecer la especificidad de unión de los mAb humanizados modificados de la invención, se aíslan linfocitos de sangre periférica (PBL) humanos de la sangre de donantes normales, tal como se describe más adelante, y se analiza la colocalización de hBAT con marcadores de linfocitos conocidos.

[0135] Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron por Ficoll y se incubaron en placas de cultivo tisular para eliminar las células adherentes. Se bloquearon los aislados en linfocitos por tamaño y granularidad y en células vivas por exclusión de yodo de propidio (PI). La unión se realiza a 4°C durante 1 hora, y se determina mediante citometría de flujo en linfocitos bloqueados.

#### EJEMPLO 6

Unión de hBAT-1 modificado a linfocitos B

[0136] El mAb humanizado modificado de la invención se produce contra las membranas de las células Daudi, una línea celular de linfoma B humano. Los PBL de donantes normales se aíslan por Ficoll, como se conoce en la técnica, seguido de adherencia a placas de cultivo tisular. Las células no adherentes se examinan para la colocalización de los anticuerpos con marcadores de células B que incluyen CD19 y CD20. La unión se realiza a 4°C durante 1 hora, y se determina mediante citometría de flujo en linfocitos bloqueados.

#### EJEMPLO 7

Estabilidad del hBAT-1 modificado

[0137] mAb CT-001 que comprenden al menos una modificación de aminoácido en una posición seleccionada de: Thr 5, Thr 20, Cys 71, Asn 75, Ser 76, Phe 93 y Phe 97 de la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1-4; Asp 54, Ser 55 y Trp 107 de la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5-9; Asn 51, Ser 52, Asp 63 y Ser 64 de la región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; o Thr 3, Ser 7, Asn 42, Ser 43, Asn 86, His 87, Asp 104, Lys 105, Thr 108, Met 135, Asp 153, Pro 154, Asp 163, Gly 164, Asn 180, Ser 181, Asn 198, Gly 199, Asn 267, Gly 268, Asp 282, Ser 283, Asp 284, Ser 285, Asn 317, His 318, Lys 330 y Met 311 de la región constante de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, se forman como se conoce en la técnica.

[0138] La estabilidad de los mAbs modificados se evalúa usando diversas técnicas bioquímicas y biofísicas que evalúan el tamaño, el estado de agregación, la estructura y los contactos intermoleculares de los anticuerpos como se conoce en la técnica. Por ejemplo, el estado de pureza y agregación de los anticuerpos se puede estudiar mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y ultracentrifugación analítica (AUC).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0139]

- 5 <110> CureTech Ltd.
- <120> VARIANTES DE ANTICUERPOS MONOCLONALES INMUNOMODULATORIOS HUMANIZADOS
- <130> CT/010 PCT
- 10 <150> 61/511.055
- <151> 2011-07-24
- <160> 31
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 106
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 25 <400> 1
  
- 30           Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
              1                           5                                   10                                   15
- Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                                  20                                   25                                   30
- 35           His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                                  35                                   40                                   45
- 40           Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
                  50                                   55                                   60
- 45           Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
              65                                   70                                   75                                   80
- 50           Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
                                  85                                   90                                   95
- 55           Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                                  100                                   105
- <210> 2
- <211> 106
- 60 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 65 <400> 2

ES 2 664 622 T3

1 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 5  
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 10  
 10 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 15  
 15 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 20  
 20 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
 25  
 25 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
 30  
 30 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 35  
 <210> 3  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 45  
 <400> 3  
 40 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 45  
 45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 50  
 50 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 55  
 55 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 60  
 60 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
 65  
 65 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

ES 2 664 622 T3

<210> 4  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 4

10

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

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

25       His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                   35                           40                           45

30       Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
           50                           55                           60

35       Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
           65                           70                           75                           80

40       Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Ser Phe Pro Leu  
                           85                           90                           95

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

<210> 5  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Péptido sintético

50

<400> 5

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

60       Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
                           20                           25                           30

65       Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
           35                           40                           45

ES 2 664 622 T3

5 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
50 55 60

10 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

15 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
85 90 95

20 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

20 Val Thr Val Ser Ser  
115

25 <210> 6  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Péptido sintético

<400> 6

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

40 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

45 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
35 40 45

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

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

60 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
85 90 95

65 Ala Lys Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

65 Val Thr Val Ser Ser  
115

65 <210> 7



ES 2 664 622 T3

<211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 7

10

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

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

20

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
 35 40 45

25

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

30

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

35

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

40

Ala Lys Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

45

<210> 8  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 8

55

60

65

ES 2 664 622 T3

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

10 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

15 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
 35 40 45

20 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
 50 55 60

25 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

30 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95

35 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

40 <210> 9  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 9

50

55

60

65

ES 2 664 622 T3

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

10 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

15 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
 35 40 45

20 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
 50 55 60

25 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

30 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95

35 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

40 Val Thr Val Ser Ser  
 115

45 <210> 10  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Péptido sintético

55 <400> 10

60

65

ES 2 664 622 T3

5 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

10 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

15 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45

20 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

25 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80

30 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

35 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 11  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

40 <400> 11

45 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

50 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

55 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 35 40 45

60 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

65

ES 2 664 622 T3

5 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

10 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
85 90 95

15 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro  
100 105 110

20 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr  
115 120 125

25 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
130 135 140

30 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
145 150 155 160

35 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser  
165 170 175

40 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala  
180 185 190

45 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe  
195 200 205

50 Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 12  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido sintético

<400> 12

ES 2 664 622 T3

5           Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
          1                   5                           10                           15

10          Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
                  20                           25                           30

15          Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
                  35                           40                           45

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 664 622 T3

	50					55						60					
5	Leu 65	Ser	Ser	Val	Val	Thr 70	Val	Pro	Ser	Ser	Ser 75	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr 80	
10	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val 85	Asn	His	Lys	Pro	Ser 90	Asn	Thr	Lys	Val	Asp 95	Lys	
15	Arg	Val	Glu	Pro	Lys 100	Ser	Cys	Asp	Lys 105	Thr	His	Thr	Cys	Pro 110	Pro	Cys	
20	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly 120	Pro	Ser	Val	Phe	Leu 125	Phe	Pro	Pro	
25	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile 135	Ser	Arg	Thr	Pro 140	Glu	Val	Thr	Cys	
30	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu 155	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 160	
35	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 165	Glu	Val	His	Asn	Ala 170	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 175	Glu	
40	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val 185	Val	Ser	Val	Leu	Thr 190	Val	Leu	
45	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 200	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 205	Val	Ser	Asn	
50	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys 215	Thr	Ile	Ser	Lys 220	Ala	Lys	Gly	
55	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro 235	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu 240	
60	Met	Thr	Lys	Asn	Gln 245	Val	Ser	Leu	Thr	Cys 250	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr 255	
65	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 265	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 270	Glu	Asn	
70	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu 280	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 285	
75	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys 295	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn 300	
80	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr 320	
85	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys 330							

ES 2 664 622 T3

<210> 13  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Péptido sintético

10

<400> 13

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
 35 40 45

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

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

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

Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

60

65



ES 2 664 622 T3

				180						185						190
5	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
				195				200					205			
10	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
		210					215					220				
15	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
	225					230					235					240
20	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
					245					250					255	
25	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
				260					265					270		
30	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
			275					280					285			
35	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
		290					295					300				
40	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
	305					310					315					320
45	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
					325					330					335	
50	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
				340					345					350		
55	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
			355					360					365			
60	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
		370					375					380				
65	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
	385					390					395					400
70	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405						410					415	
75	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			420						425					430		

ES 2 664 622 T3

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445  
 5  
 <210> 14  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (93) .. (93)  
 <223> Xaa = Ala, Leu o Val  
 20 <400> 14  
 25 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 35 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 40 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 45 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80  
 50 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Xaa Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 55 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 60 <210> 15  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97) .. (97)  
 <223> Xaa = Ala, Leu o Val

ES 2 664 622 T3

<400> 15

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

10           Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                           20                                   25                                   30

15           His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                   35                                   40                                   45

20           Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                                   55                                   60

25           Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
           65                                   70                                   75                                   80

30           Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
                           85                                   90                                   95

30           Xaa Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                           100                                   105

35           <210> 16  
           <211> 106  
           <212> PRT  
           <213> Secuencia artificial

40           <220>  
           <223> Péptido sintético

45           <220>  
           <221> MISC\_FEATURE  
           <222> (93) .. (93)  
           <223> Xaa = Ala, Leu o Val

          <400> 16

50

55

60

65

ES 2 664 622 T3

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

10           Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                           20                           25                           30

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

20           Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                           55                           60

25           Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
           65                           70                           75                           80

30                    Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Xaa Pro Leu Thr  
   85                           90                           95

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

35           <210> 17  
           <211> 106  
           <212> PRT  
           <213> Secuencia artificial

40           <220>  
           <223> Péptido sintético

45           <220>  
           <221> MISC\_FEATURE  
           <222> (97) .. (97)  
           <223> Xaa = Ala, Leu o Val

          <400> 17

50

55

60

65

ES 2 664 622 T3

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

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

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

          Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                                   55                                   60

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

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

          Xaa Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                           100                                   105

35           <210> 18  
             <211> 106  
             <212> PRT  
             <213> Secuencia artificial

40           <220>  
             <223> Péptido sintético

45           <220>  
             <221> MISC\_FEATURE  
             <222> (93) .. (93)  
             <223> Xaa = Ala, Leu o Val

            <400> 18

50

55

60

65

ES 2 664 622 T3

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

10           Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                           20                           25                           30

15           His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                   35                           40                           45

20           Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                           55                           60

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

30           Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Xaa Pro Leu Thr  
                           85                           90                           95

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

<210> 19  
 <211> 106  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97) .. (97)  
 <223> Xaa = Ala, Leu o Val

45 <400> 19

50           Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
             1                   5                           10                           15

55           Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                           20                           25                           30

60           His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                   35                           40                           45

65

5 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

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

15 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
85 90 95

20 Xaa Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

25 <210> 20  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (93) .. (93)  
<223> Xaa = Ala, Leu o Val

35 <400> 20

40 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

50 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
35 40 45

55 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

60 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

65 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Xaa Pro Leu Thr  
85 90 95

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

<210> 21  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97) .. (97)  
 <223> Xaa = Ala, Leu o Val  
 <400> 21  
 15  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 20 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 25 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 30 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 35 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80  
 40 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 45 Xaa Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 22  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 55 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (93) .. (93)  
 <223> Xaa = Ala, Leu o Val  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (97) .. (97)  
 <223> Xaa = Ala, Leu o Val  
 65 <400> 22



ES 2 664 622 T3

5                   Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
       1                           5                           10                           15  
 10    Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                           20                           25                           30  
 15    His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                   35                           40                           45  
 20    Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
           50                           55                           60  
 25    Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
       65                           70                           75                           80  
 30    Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Xaa Pro Leu Thr  
                           85                           90                           95  
 35    Xaa Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                           100                           105  
 35    <210> 23  
       <211> 106  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial  
 40    <220>  
       <223> Péptido sintético  
       <400> 23  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 664 622 T3

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

10           Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                           20                           25                           30

15           His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                   35                           40                           45

20           Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                           55                           60

25           Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
             65                           70                           75                           80

30           Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Ala Pro Leu Thr  
                           85                           90                           95

35           Ala Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                           105

35           <210> 24  
             <211> 117  
             <212> PRT  
             <213> Secuencia artificial

40           <220>  
             <221> MISC\_FEATURE  
             <222> (107)..(107)  
             <223> Xaa = Ala, Leu, Tyr o Val

45           <400> 24

50

55

60

65

ES 2 664 622 T3

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

10 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

15 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
 35 40 45

20 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
 50 55 60

25 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

30 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95

35 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Xaa Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 25  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (107) .. (107)  
 <223> Xaa = Ala, Leu, Tyr o Val

50 <400> 25

55  
 60  
 65

ES 2 664 622 T3

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

10 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

15 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
35 40 45

20 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
50 55 60

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

30 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
85 90 95

35 Ala Lys Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Xaa Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

35 Val Thr Val Ser Ser  
115

40 <210> 26  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Péptido sintético

50 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (107) .. (107)  
<223> Xaa = Ala, Leu, Tyr o Val

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

60 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

65 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
35 40 45

ES 2 664 622 T3

5 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 10 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 15 Ala Lys Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Xaa Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 20 Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 27  
 25 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Péptido sintético  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (107) .. (107)  
 35 <223> Xaa = Ala, Leu, Tyr o Val  
 <400> 27  
 40 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 45 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 50 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
 35 40 45  
 55 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
 50 55 60  
 60 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 65 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Xaa Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

ES 2 664 622 T3

5 Val Thr Val Ser Ser  
115

10 <210> 28  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Péptido sintético

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (107) .. (107)  
<223> Xaa = Ala, Leu, Tyr o Val

<400> 28

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

30 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

35 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
35 40 45

40 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
50 55 60

45 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

50 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
85 90 95

55 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Xaa Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110

60 Val Thr Val Ser Ser  
115

60 <210> 29  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Péptido sintético

ES 2 664 622 T3

<400> 29

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

10           Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                           20                                   25                                   30

15           His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
                           35                                   40                                   45

20           Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                                   55                                   60

25           Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
           65                                   70                                   75                                   80

30           Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Ala Pro Leu Thr  
                           85                                   90                                   95

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

35 <210> 30  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 30

45

50

55

60

65

ES 2 664 622 T3

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

10     Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met  
     20                                    25                                    30

15     His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr  
     35                                    40                                    45

20     Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
     50                                    55                                    60

25     Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu  
       65                                    70                                    75                                    80

30     Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr  
     85                                    90                                    95

35     Ala Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

35     <210> 31  
       <211> 117  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial

40     <220>  
       <223> Péptido sintético

<400> 31

45

50

55

60

65



ES 2 664 622 T3

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

10 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

15 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met  
 35 40 45

20 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
 50 55 60

25 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

30 Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95

35 Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Ala Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

40 Val Thr Val Ser Ser  
 115

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5 1. Un anticuerpo humanizado BAT-1 (hBAT-1) o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 30, y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 31.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, que tiene una actividad antitumoral similar, o mayor que, mBAT-1; o que tiene una actividad antitumoral similar o mayor que hBAT-1.
- 15 3. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el fragmento del anticuerpo humanizado se selecciona del grupo que consiste en: Fv, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> y un anticuerpo monocatenario.
- 20 4. Una secuencia de polinucleótidos que codifica el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o fragmentos del mismo, donde el polinucleótido comprende una secuencia que codifica dicha región variable de cadena ligera, una secuencia que codifica dicha región variable de cadena pesada, o ambas.
- 25 5. Un vector que comprende la secuencia de polinucleótidos de la reivindicación 4.
6. Una célula huésped que contiene un vector de la reivindicación 5.
- 30 7. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un vehículo, diluyente o estabilizante farmacéuticamente aceptable.
- 35 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 para uso en el tratamiento del cáncer o un trastorno de inmunodeficiencia.
- 40 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que el sujeto tiene un tumor seleccionado de un tumor sólido o tumor no sólido, preferiblemente en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un carcinoma colorrectal, un cáncer de pulmón no pequeño (NSCLC), un cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), un carcinoma de mama; un melanoma; un carcinoma ovárico, un carcinoma cervical, un cáncer pancreático, un carcinoma de cabeza y cuello, un carcinoma gastrointestinal, un tumor esofágico, un carcinoma hepatocelular, mieloma múltiple, un carcinoma de células renales, un tumor de próstata, un linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, linfoma de células del manto, sarcoma de Kaposi, un carcinoma de células escamosas, un carcinoma de células basales, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC), más preferiblemente el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: carcinoma colorrectal, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de cabeza y cuello, tumor esofágico, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, linfoma no Hodgkin y enfermedad de Hodgkin.
- 45 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que el sujeto tiene un tumor no sólido, preferiblemente en el que el sujeto tiene una malignidad hematológica.

50

55

60

65

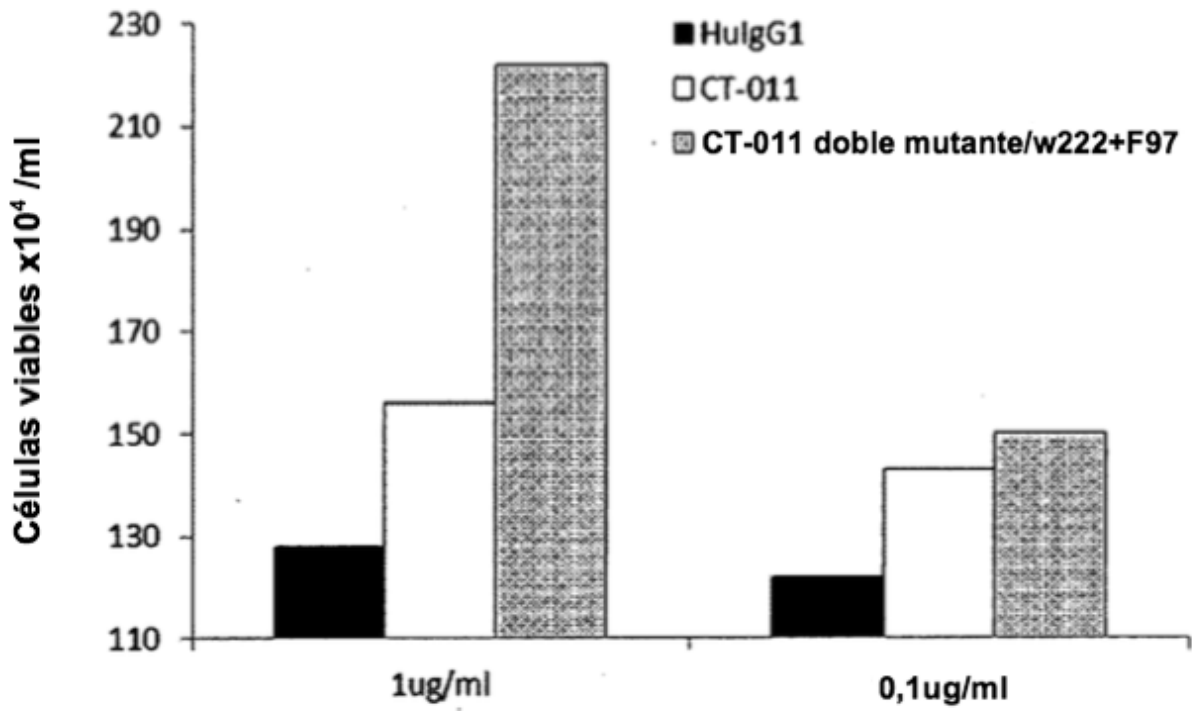


Figura 1