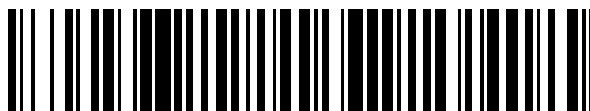


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 548**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2011 E 16200557 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3156420**

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

30 Prioridad:

06.12.2010 US 420291 P

25.02.2011 US 201161446990 P

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

11.07.2019

73 Titular/es:

SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)
21823 30th Drive, S.E.
Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

SMITH, MARIA LEIA;
SUSSMAN, DJANGO;
ARTHUR, WILLIAM y
NESTEROVA, ALBINA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 719 548 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados para liv-1 y uso de los mismos para tratar el cáncer

5 ANTECEDENTES

LIV-1 es un miembro de la subfamilia de proteínas transportadoras de zinc LZT (transportadoras de zinc LIV-1-ZIP). Taylor y col., Biochim. Biophys. Acta 1611:16-30 (2003). El análisis computarizado de la proteína LIV-1 revela un posible motivo de metaloproteasa, que se ajusta a la secuencia de consenso para el motivo catalítico del sitio de unión a zinc de la metaloproteasa de zinc. El ARNm de LIV-1 se expresa principalmente en la mama, la próstata, la glándula pituitaria y el tejido cerebral.

La proteína LIV-1 también se ha implicado en ciertas afecciones cancerosas, por ejemplo, el cáncer de mama y el cáncer de próstata. La detección de LIV-1 se asocia al cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo, McClelland y col., Br. J. Cancer 77:1653-1656 (1998), y la diseminación metastásica de estos cánceres a los ganglios linfáticos regionales. Manning y col., Eur. J. Cancer 30A:675-678 (1994). Composiciones contra el antígeno del cáncer LIV-1 y usos de las mismas se describen en el documento WO 2004/067564.

RESUMEN DE LA INVENCION REIVINDICADA

La invención proporciona un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 15.

La invención también proporciona un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican una región variable de cadena pesada madura y una región variable de cadena ligera madura como se define en la invención.

La invención también proporciona un anticuerpo humanizado de la invención para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene o está en riesgo de cáncer.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado de la invención.

La descripción también proporciona un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 53, siempre que la posición H27 esté ocupada por L, la posición H29 esté ocupada por I, H30 por E y H94 por V y una región variable de cadena ligera madura al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 60 siempre que la posición L36 esté ocupada por Y y la posición L46 por P. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado comprende tres CDR de SEQ ID NO: 53 y tres CDR de SEQ ID NO: 60. Esas CDR se muestran en la figura 16. Opcionalmente, la posición H76 está ocupada por N. Opcionalmente, el humanizado comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 53 y una región variable de cadena ligera madura al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 60. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada y la región constante de cadena ligera madura se fusiona con una región constante de cadena ligera. Opcionalmente, la región constante de cadena pesada es una forma mutante de la región constante humana natural que tiene una unión reducida a un receptor de Fc γ en relación con la región constante humana natural. Opcionalmente, la región constante de cadena pesada es de isotipo IgG1. Opcionalmente, la región constante de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 44 y la región constante de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 42. Opcionalmente, la región constante de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 46 (S239C) y la región constante de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 42. En algunos de dichos anticuerpos humanizados, cualquier diferencia en las CDR de la región variable de cadena pesada madura y la región variable ligera madura de la SEQ ID NO: 52 y 60 residen respectivamente en las posiciones H60-H65. En algunos de dichos anticuerpos humanizados, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 52 o 53 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 59 o 60. En algunos de dichos anticuerpos humanizados, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 53 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 60. Algunos de dichos anticuerpos humanizados se conjugan con un agente citotóxico o citostático. Algunos de dichos anticuerpos humanizados tienen una constante de asociación para LIV-1 humana o de mono cynomolgus de 0,5 a $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

La descripción también proporciona un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las tres CDR de Kabat de la SEQ ID NO: 52, donde la posición H27 está ocupada por L, la posición H29 está ocupada por I, H30 por E, H76 por N y H94 por V, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las tres CDR de Kabat de la SEQ ID NO: 60, siempre que la posición L36 esté ocupada por Y y la posición L46 por P.

La invención también proporciona un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican una región variable de cadena pesada madura y/o una región variable de cadena ligera madura de cualquiera de los anticuerpos humanizados definidos anteriormente.

La invención proporciona además un anticuerpo humanizado de la invención para su uso en el procedimiento de tratamiento de un paciente que tiene o está en riesgo de cáncer. El cáncer puede ser, por ejemplo, un cáncer de mama, cáncer cervical, melanoma o un cáncer de próstata.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado de la invención.

También se describen procedimientos para tratar a un sujeto afectado por un melanoma que expresa la proteína LIV-1 administrando al sujeto un anticuerpo específico de LIV-1 o un conjugado farmacológico de anticuerpo LIV-1, en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de las células cancerosas del melanoma.

También se describen procedimientos para tratar a un sujeto afectado por un cáncer cervical que expresa la proteína LIV-1 administrando al sujeto un anticuerpo LIV-1 específico o un conjugado farmacológico de anticuerpo LIV-1, en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de las células del cáncer cervical.

En el presente documento, también se describe un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a HB (SEQ ID NO: 10) y una región variable de cadena ligera madura al menos el 90 % idéntica a LB (SEQ ID NO: 15). Opcionalmente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a HB y una región variable de cadena ligera madura al menos el 95 % idéntica a LB. Opcionalmente, en cualquiera de dichos anticuerpos, las posiciones H29, H30 y H76 están ocupadas por I, E y N, y L36 está ocupada por Y. Opcionalmente, cualquier diferencia en los marcos de la región variable de la región variable de cadena pesada madura y la SEQ ID NO: 10 se selecciona(n) del grupo que consiste en H27 ocupada por F, H28 ocupada por N, H48 ocupada por I, H66 ocupada por K, H67 ocupada por A, H71 ocupada por A, H76 ocupada por N, H93 ocupada por N, H94 ocupada por V, L37 ocupada por L, L39 ocupada por K, L45 ocupada por K y L46 ocupada por L. Opcionalmente, las 3 CDR de la región variable de cadena pesada madura son las de la SEQ ID NO: 10 y las 3 CDR de la región variable de cadena ligera madura son las de la SEQ ID NO: 15. Las CDR se muestran en la Fig. 1. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada y la región constante de cadena ligera madura se fusiona con una región constante de cadena ligera. Opcionalmente, la región constante de cadena pesada es una forma mutante de la región constante humana natural que tiene una unión reducida a un receptor de Fcγ en relación con la región constante humana natural. Opcionalmente, la región constante de cadena pesada es de isotipo IgG1. Opcionalmente, la región constante de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 6 y la región constante de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 4. Opcionalmente, la región constante de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 8 (S239C) y la región constante de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 4. Opcionalmente, cualquier diferencia en las CDR de la región variable de cadena pesada madura y la región variable ligera madura de la SEQ ID NO: 10 y 15 reside respectivamente en las posiciones H60-H65. Opcionalmente, la región variable de cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 10 y la región variable de cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 15. Opcionalmente, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico o citostático. Anticuerpos humanizados preferidos tienen mayor afinidad por LIV-1 que el anticuerpo BR2-14a. En otra realización, el anticuerpo humanizado tiene una constante de asociación para LIV-1 humana o de mono cynomolgus de $0,5 \text{ a } 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

También se describe un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada madura que comprende las 3 CDR de la SEQ ID NO: 10 y donde las posiciones H29, H30 y H76 están ocupadas por I, E y N respectivamente, y una región variable de cadena ligera madura que comprende las 3 CDR de la SEQ ID NO: 15, y donde la posición L36 está ocupada por Y.

También se describe un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada madura y/o una región

variable de cadena ligera madura de cualquiera de los anticuerpos humanizados descritos anteriormente.

También se describe un procedimiento para tratar a un paciente que tiene o está en riesgo de cáncer, que comprende administrar al paciente un régimen eficaz de un anticuerpo humanizado tal como se ha descrito anteriormente.

- 5 Opcionalmente, el cáncer es cáncer de mama, cáncer cervical, melanoma o un cáncer de próstata.

También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado tal como se ha descrito anteriormente.

- 10 También se describe un procedimiento para tratar a un paciente que tiene o está en riesgo de cáncer de mama triple negativo, que comprende administrar al paciente un régimen eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a LIV-1. Opcionalmente, en dichos procedimientos, el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico o citostático.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

La **figura 1** muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos del mAb murino parental (denominado BR2-14a) con las regiones variables de cadena pesada de LIV-1 humanizada (dos paneles superiores) y de cadena ligera (dos paneles inferiores).

- 20 La **figura 2** muestra las curvas de unión para los mAb de LIV-1 humanizada y el anticuerpo murino parental (denominado BR2-14a).

La **figura 3** muestra los resultados de los estudios de unión de competición de los mAb de LIV-1 humanizada y el anticuerpo murino parental (denominado BR2-14a). Los números entre paréntesis después de cada variante indican el número de retromutaciones.

- 25 La **figura 4** muestra los resultados de los estudios de unión de saturación en células MCF7. BR2-14a-AF se refiere al anticuerpo murino parental marcado con AF. hLIV-14 se refiere al anticuerpo HBLB marcado con AF, un anticuerpo humanizado que se une específicamente a LIV-1.

La **figura 5** muestra los resultados de los estudios de unión de competición en células CHO que expresan la proteína LIV-1 recombinante. BR2-14a se refiere al anticuerpo murino parental. hLIV-14 HBLB WT se refiere al anticuerpo HBLB. hLIV-14 HBLB S239C se refiere al anticuerpo HBLB que tiene sustituciones de serina a cisteína en cada posición en la cadena pesada.

- 30 La **figura 6** muestra un análisis de la expresión de la proteína LIV-1 por IHC en muestras de pacientes con cáncer de mama con tratamiento pos-hormonal.

La **figura 7** muestra un análisis de la expresión de la proteína LIV-1 por IHC en muestras de pacientes con cáncer de próstata metastásico refractario a las hormonas.

- 35 La **figura 8** muestra un análisis de la expresión de la proteína LIV-1 por IHC en muestras de pacientes con cáncer de mama triple negativo.

La **figura 9** muestra los resultados de los ensayos de citotoxicidad en los conjugados farmacológicos del anticuerpo hLIV-14, es decir, el mAb HBLB conjugado con vcMMAE (1006) o mcMMAF (1269), así como los conjugados de anticuerpos murinos (mIgG) y humanos (hIgG) de control. hLIV-14-SEA-1006 se refiere a una forma no fucosilada del mAb HBLB conjugado con vcMMAE (1006).

- 40 La **figura 10** muestra los resultados de un ensayo de ADCC *in vitro* en células MCF7 utilizando células NK humanas (donante 1; V/V). hLIV-14 WT se refiere al mAb HBLB. hLIV-14 SEA se refiere a la forma no fucosilada del mAb HBLB. hLIV-14 mcMMAF se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del mAb HBLB conjugado con mcMMAF. hLIV-14 vcMMAE se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del mAb HBLB conjugado con vcMMAE. hLIV-14 SEA vcMMAE se refiere a una forma no fucosilada del conjugado farmacológico de anticuerpo HBLB mAb-vcMMAE.

La **figura 11** muestra los resultados de un ensayo de ADCC *in vitro* en células MCF7 utilizando células NK humanas (donante 2). hLIV-14 WT se refiere al mAb HBLB. hLIV-14 SEA se refiere a la forma no fucosilada del mAb HBLB.

- 50 cLIV-14 SEA se refiere a la forma no fucosilada del anticuerpo murino parental quimérico. hLIV-14 mcF(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del mAb HBLB con un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco mcMMAF por anticuerpo. hLIV-14 vcE(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del mAb HBLB con un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. hLIV-14 vcE (4) SEA se refiere a una forma no fucosilada del conjugado farmacológico de anticuerpo mAb HBLB-vcMMAE que tiene un promedio de cuatro moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. hIgG se refiere a la IgG humana de control. H00-mcF(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo de control de un anticuerpo no vinculante con un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco mcMMAF por anticuerpo. H00-vcE(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo de control de un anticuerpo no vinculante con un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo.

- 60 La **figura 12** muestra los resultados de un estudio de xenoinjerto de la línea de cáncer de mama MCF7 en ratones

- desnudos. cLIV-14-mcMMAF(4) se refiere a un conjugado de fármaco de anticuerpo de la forma quimérica del anticuerpo murino parental que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco mcMMAF por anticuerpo. cLIV-14-vcMMAE(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo de la forma quimérica del anticuerpo murino parental que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. H00-mcMMAF(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo de un anticuerpo de control no vinculante que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco mcMMAF por anticuerpo. H00-vcMMAE(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo de un anticuerpo de control no vinculante que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. La dosis y el tiempo de administración se indican en la figura.
- 10 La **figura 13** muestra los resultados de un estudio de xenoinjerto de la línea de cáncer de próstata PC3 en ratones macho desnudos. cLIV-14-vcMMAE(4) se refiere a un conjugado de fármaco de anticuerpo de la forma quimérica del anticuerpo murino parental que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. hBU12-vcMMAE(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo de la forma quimérica de un anticuerpo anti-CD19 que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. La dosis y el tiempo de administración se indican en la figura.
- 15 La **figura 14** muestra los resultados de un estudio de xenoinjerto de la línea de cáncer de mama MCF7 en ratones desnudos. hLIV-14-vcMMAE(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. hLIV-14d-vcMMAE(2) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene un promedio de 2 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo, cada uno conjugado en la posición S239C de cada cadena pesada. H00-vcMMAE(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo de un anticuerpo de control no vinculante que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. La dosis y el tiempo de administración se indican en la figura.
- 20 La **figura 15** muestra los resultados de un estudio de xenoinjerto de la línea de cáncer de próstata PC3 en ratones macho desnudos. hLIV-14-vcMMAE(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. hLIV-14-mcMMAF(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco mcMMAF por anticuerpo. hLIV-14d-vcMMAE(2) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene un promedio de 2 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo, cada una conjugada en la posición S239C de cada cadena pesada. hLIV-14d-mcMMAF(2) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo del anticuerpo HBLB que tiene un promedio de 2 moléculas enlazadoras de fármaco mcMMAF por anticuerpo, cada una conjugada en la posición S239C de cada cadena pesada. H00-vcMMAE(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo de un anticuerpo de control no vinculante que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco vcMMAE por anticuerpo. H00-mcMMAF(4) se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo de un anticuerpo de control no vinculante que tiene un promedio de 4 moléculas enlazadoras de fármaco mcMMAF por anticuerpo. La dosis y el tiempo de administración se indican en la figura.
- 30 Las **figuras 16A y 16B** muestran alineamientos de regiones variables maduras humanizadas de cadena pesada (**figura 16A**) y de cadena ligera (**figura 16B**) con las del ratón BR2-22a.
- 35 La **figura 17** muestra los ensayos de unión de competición de diferentes permutaciones de cadenas pesadas humanizadas HA-HF y de cadenas ligeras humanizadas LA-LF derivadas del anticuerpo anti-LIV-1 monoclonal murino BR2-22a. El número total de retromutaciones murinas en cada cadena ligera o pesada se muestra entre paréntesis. Sólo HELF mostró suficiente retención de unión.
- 40 La **figura 18** muestra la variación sistemática de las cadenas HE y LF para probar la contribución de las retromutaciones individuales a la unión al antígeno. Los sitios de hipermutación somática potencial están entre paréntesis. Los residuos del ratón están subrayados. Los residuos restantes son residuos de la línea germinal humana.
- 45 La **figura 19** muestra la unión de competición de las variantes de LF en la parte superior de la figura. Las retromutaciones probadas se muestran en la parte inferior de la figura. Los residuos del ratón están subrayados. Los residuos restantes son residuos de la línea germinal humana.
- 50 La **figura 20** muestra la unión de competición de las variantes de HE en la parte superior de la figura. Las retromutaciones probadas se muestran en la parte inferior de la figura. Los residuos del ratón están subrayados. Los residuos restantes son residuos de la línea germinal humana.
- La **figura 21** muestra la unión de competición de diferentes permutaciones de HE, HF, HG y LF y LG.
- 55 La **figura 22** muestra la unión de saturación del anticuerpo de LIV14 humanizada y el anticuerpo de LIV22 humanizada en LIV-1 humana y de cynomolgus expresado a partir de células CHO.
- La **figura 23** muestra la actividad citotóxica de LIV22-vcMMAE humanizada en células MCF-7 después de 144 horas de tratamiento. h00-1006 es un anticuerpo de control de conjugado farmacológico.
- La **figura 24** muestra la actividad citotóxica de hLIV22-mcMMAF en células MCF-7 después de 144 horas de tratamiento. h00-1269 es un anticuerpo de control de conjugado farmacológico.
- 60 La **figura 25** muestra la actividad del anticuerpo de hLIV22 en el modelo de carcinoma de próstata PC3 (DSMZ) en

ratones hembra desnudos. Los días de dosis se indican mediante triángulos en el eje X.

La **figura 26** muestra la actividad del anticuerpo de hLIV22 en tumores carcinomas de mama MCF7 (NCI) en ratones desnudos.

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

- 5 La **figura 28** muestra un análisis de la expresión de la proteína LIV-1 por IHC en muestras de pacientes con cáncer melanoma.

DEFINICIONES

- 10 Los anticuerpos monoclonales se proporcionan típicamente en forma aislada. Esto significa que un anticuerpo es típicamente al menos en un 50 % en peso puro en cuanto a proteínas interferentes y otros contaminantes que surgen de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el anticuerpo monoclonal se combine con un exceso de portador(es) farmacéutico(s) aceptable(s) u otro vehículo destinado a facilitar su uso. A veces, los anticuerpos monoclonales son al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 o 99 % en peso puros en cuanto a proteínas
- 15 interferentes y contaminantes de la producción o purificación.

La unión específica de un anticuerpo monoclonal a su antígeno diana significa una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M⁻¹. La unión específica es perceptiblemente de mayor magnitud y se distingue de la unión no específica que se produce al menos a una diana no relacionada. La unión específica puede ser el resultado de la formación de

- 20 enlaces entre grupos funcionales particulares o un ajuste espacial particular (por ejemplo, de tipo cerradura y llave), mientras que la unión no específica suele ser el resultado de las fuerzas de van der Waals. Sin embargo, la unión específica no necesariamente implica que un anticuerpo monoclonal se una a una y solo una diana.

La unidad estructural del anticuerpo básico es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares

25 idénticos de cadenas polipeptídicas, donde cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Esta región variable se expresa inicialmente vinculada a un péptido de señal escindible. La región variable sin el péptido de señal se denomina a veces región variable madura. Por lo tanto, por ejemplo, una región variable

30 madura de cadena ligera, significa una región variable de cadena ligera sin el péptido de señal de cadena ligera. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante que es la principal responsable de la función efectora.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gama, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las

35 cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, e incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Véase, en general, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2.^a ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7).

- 40 Las regiones variables maduras de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos. Todas las cadenas presentan la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco,
- 45 permitiendo la unión a un epítipo específico. Desde el extremo N al extremo C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991) o Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia y col., *Nature* 342:878-883 (1989). Kabat también proporciona una convención de numeración ampliamente utilizada
- 50 (numeración de Kabat) en la que a los residuos correspondientes entre diferentes cadenas pesadas o entre diferentes cadenas ligeras se les asigna el mismo número.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y fragmentos de unión de los mismos. Típicamente, los fragmentos de anticuerpos compiten con el anticuerpo intacto del cual se derivaron para la unión específica a la diana, incluidas

55 cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, diacuerpos, Dabs, nanocuerpos y Fv. Los fragmentos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también incluye un diacuerpo (fragmento Fv homodimérico) o un minicuerpo (VL-VH-CH3), un anticuerpo biespecífico o similar. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes (véase, por

60 ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148:1547-53

(1992)). El término "anticuerpo" incluye un anticuerpo en sí mismo (anticuerpo desnudo) o un anticuerpo conjugado con un fármaco citotóxico o citostático.

El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítopo puede formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más generalmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, *por ejemplo*, Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Los anticuerpos que reconocen los epítopos idénticos o superpuestos pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para competir con la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. El epítipo de un anticuerpo también se puede definir por cristalografía de rayos X del anticuerpo unido a su antígeno para identificar residuos de contacto. Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

La competencia entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que un anticuerpo bajo ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común (véase, por ejemplo, Junghans y col., Cancer Res. 50:1495, 1990). Un anticuerpo de ensayo compite con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de ensayo (por ejemplo, al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la unión del anticuerpo de referencia en al menos el 50 %, pero preferentemente en el 75 %, 90 % o 99 % según lo medido en un ensayo de unión de competitiva. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competencia (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente lo suficientemente cercano al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que tenga lugar el impedimento estérico.

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

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

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

Las composiciones o procedimientos "que comprenden" uno o más elementos mencionados anteriormente pueden incluir otros elementos no mencionados específicamente anteriormente. Por ejemplo, una composición que comprende anticuerpo puede contener el anticuerpo solo o en combinación con otros ingredientes.

La designación de un rango de valores incluye todos los enteros dentro o definiendo el rango.

Una función efectora de anticuerpo se refiere a una función contribuida por un dominio o dominios Fc de una Ig. Dichas funciones pueden ser, por ejemplo, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente de complementos. Dicha función puede efectuarse, por ejemplo, mediante la unión de un dominio o dominios efector(es) de Fc con un receptor de Fc en una célula inmune con actividad fagocítica o lítica o mediante la unión de un dominio o dominios efector(es) de Fc con componentes del sistema del complemento. Típicamente, el (los) efecto(s) mediado(s) por las células de unión a Fc o los componentes

del complemento dan como resultado la inhibición y/o el agotamiento de la célula dirigida a LIV-1. Las regiones Fc de los anticuerpos pueden reclutar células que expresan el receptor de Fc (FcR) y yuxtaponerlas con células diana recubiertas de anticuerpos. Las células que expresan FcR superficial para las IgG, incluidas FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD64) pueden actuar como células efectoras para la destrucción de células recubiertas con IgG.

- 5 Dichas células efectoras incluyen monocitos, macrófagos, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y eosinófilos. El compromiso de FcγR por IgG activa la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). La ADCC es mediada por células efectoras CD16⁺ a través de la secreción de proteínas formadoras de poros y proteasas, mientras que la fagocitosis es mediada por células efectoras CD32⁺ y CD64⁺ (véase *Fundamental Immunology*, 4.^a ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, capítulos 3, 17 y 30; Uchida y col., 2004, *J. Exp. Med.* 199:1659-69; Akewanlop y col., 2001, *Cancer Res.* 61:4061-65; Watanabe y col., 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207). Además de ADCC y ADCP, las regiones Fc de los anticuerpos unidos a las células también pueden activar la vía clásica del complemento para provocar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). C1q del sistema del complemento se une a las regiones Fc de los anticuerpos cuando están complejados con antígenos. La unión de C1q a los anticuerpos unidos a la célula puede iniciar una cascada de eventos
- 10 que involucran la activación proteolítica de C4 y C2 para generar la C3 convertasa. La escisión de C3 a C3b por C3 convertasa permite la activación de los componentes del complemento terminal, incluidos C5b, C6, C7, C8 y C9. En conjunto, estas proteínas forman poros complejos de ataque de membrana en las células recubiertas con anticuerpos. Estos poros interrumpen la integridad de la membrana celular, matando la célula diana (véase *Immunobiology*, 6.^a ed., Janeway y col., Garland Science, N. Y., 2005, capítulo 2).

- 20 El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o ADCC es un mecanismo para inducir la muerte celular que depende de la interacción de células diana recubiertas con anticuerpos con células inmunes que poseen actividad lítica (también conocidas como células efectoras). Dichas células efectoras incluyen células asesinas naturales, monocitos/macrófagos y neutrófilos. Las células efectoras se unen a un dominio o dominios efector(es) Fc de Ig unido
- 25 a las células diana a través de sus sitios de combinación de antígeno. La muerte de la célula diana recubierta con anticuerpo se produce como resultado de la actividad celular efectora.

- El término "fagocitosis celular dependiente de anticuerpos" o ADCP se refiere al proceso mediante el cual las células recubiertas con anticuerpos son internalizadas, en su totalidad o en parte, por células inmunes fagocíticas (*por ejemplo*, células macrófagos, neutrófilos y dendríticas) que se unen a un dominio o dominios efector(es) Fc de Ig.
- 30

- El término "citotoxicidad dependiente del complemento" o CDC se refiere a un mecanismo para inducir la muerte celular en el que un dominio o dominios efector(es) Fc de un anticuerpo unido a la diana activa una serie de reacciones enzimáticas que culminan en la formación de agujeros en la membrana celular diana. Normalmente, los complejos
- 35 antígeno-anticuerpo, como los de las células diana recubiertas con anticuerpo, se unen y activan el componente del complemento C1q, que a su vez activa la cascada del complemento que conduce a la muerte de la célula diana. La activación del complemento también puede resultar en la deposición de componentes del complemento en la superficie de la célula diana que facilitan la ADCC al unirse a los receptores del complemento (por ejemplo, CR3) en los leucocitos.

- 40 Un "efecto citotóxico" se refiere al agotamiento, la eliminación y/o la destrucción de una célula diana. Un "agente citotóxico" se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico en una célula. Los agentes citotóxicos pueden conjugarse con un anticuerpo o administrarse en combinación con un anticuerpo.

- 45 Un "efecto citostático" se refiere a la inhibición de la proliferación celular. Un "agente citostático" se refiere a un agente que tiene un efecto citostático en una célula, inhibiendo así el crecimiento y/o expansión de un subconjunto específico de células. Los agentes citostáticos pueden conjugarse con un anticuerpo o administrarse en combinación con un anticuerpo.

- 50 El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado o que puede aprobarse por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se encuentra un anticuerpo anti-LIV-1.

- 55 La frase "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un anticuerpo anti-LIV-1 o conjugado del mismo o agente administrado con un anticuerpo anti-LIV-1. Las sales ejemplares incluyen sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato,
- 60 succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato,

metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metileno bis-(2 hidroxí 3 naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier fracción orgánica o inorgánica que estabilice la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

A menos que resulte evidente a partir del contexto, el término "aproximadamente" abarca valores dentro de una desviación estándar de un valor establecido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. General

La invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a LIV-1. Los anticuerpos son útiles para el tratamiento y diagnóstico de diversos cánceres, así como para detectar LIV-1.

II. Moléculas dianas

A menos que se indique lo contrario, LIV-1 significa una LIV-1 humana. A una secuencia humana ejemplar se le asigna el número de acceso de Swiss Prot Q13433. Q13433 se incluye en el presente documento como SEQ ID NO: 83. Se conocen tres variantes de isoformas y un polimorfismo. Una segunda versión de la proteína LIV-1 humana, número de acceso AAA96258.2, se incluye en el presente documento como SEQ ID NO: 84. Cuatro dominios extracelulares están limitados por los residuos 29-325, 377-423, 679-686 y 746-755 de Q13433, respectivamente.

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

III. Anticuerpos

A. Especificidad vinculante y propiedades funcionales

En el presente documento se describen anticuerpos humanizados derivados de dos anticuerpos de ratón, BR2-14a y BR2-22a. A menos que se indique específicamente lo contrario, las presentes descripciones se refieren a ambos anticuerpos. Los dos anticuerpos de ratón muestran una identidad de secuencia del 94 % y 91 % entre sí en las regiones variables de cadena pesada y ligera maduras. Los dos anticuerpos se unen a epítomos iguales o superpuestos en la LIV-1 humana. Sin embargo, el anticuerpo BR2-22a tiene una afinidad aproximadamente diez veces mayor para LIV-1 humana y una afinidad aproximadamente 3 veces mayor para LIV-1 de mono cynomolgus que el BR2-14a como se muestra en la Fig. 22.

La afinidad de las formas humanizadas del anticuerpo BR2-14a de ratón (es decir, K_a) está preferentemente dentro de un factor de cinco o un factor de dos con respecto a la del anticuerpo BR2-14a de ratón para LIV-1 humana. Los anticuerpos BR2-14a humanizados se unen específicamente a LIV-1 humana en forma nativa y/o expresados de forma recombinante a partir de células CHO como lo hace el anticuerpo de ratón del que se derivaron. Los anticuerpos BR2-14a humanizados preferidos tienen una afinidad igual o mayor que (es decir, mayor que el margen de error en la medición) la de BR2-14a para LIV-1 humana (por ejemplo, 1,1-5 veces, 1,1 a 3 veces, 1,5 a 3 veces, 1,7 a 2,3 veces o 1,7-2,1 veces la afinidad o aproximadamente el doble de la afinidad de BR2-14a). Los anticuerpos BR2-14a humanizados preferidos se unen al mismo epítipo y/o compiten con el BR2-14a para unirse a la LIV-1 humana. Los anticuerpos BR2-14a humanizados preferidos también se unen al homólogo cyno de LIV-1, lo que permite realizar ensayos preclínicos en primates no humanos.

La afinidad de las formas humanizadas del anticuerpo BR2-22a de ratón (es decir, K_a) para la LIV-1 humana, expresada nativamente o expresada a partir de células CHO, está preferentemente dentro de un factor de cinco o un factor de dos con respecto a la del anticuerpo BR2-22 de ratón. Algunos anticuerpos BR2-22a humanizados tienen una constante de asociación que es esencialmente la misma que la de BR2-22a (es decir, dentro del error experimental). Algunos anticuerpos BR2-22a humanizados tienen una constante de asociación dentro de un rango de 0,5 a 1 o 0,5-1,5 con respecto a la constante de asociación del anticuerpo BR2-22a. Los anticuerpos BR2-22a humanizados preferidos tienen una constante de asociación mayor que $5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ o en un rango de 0,5 a $2 \times 10^9 \text{M}^{-1}$.

o aproximadamente $0,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (+/- error en la medición) para LIV-1 humana expresada a partir de células CHO. Aquí, como en otras partes de esta solicitud, las afinidades se pueden medir de acuerdo con los procedimientos de los ejemplos. Los anticuerpos BR2-22a humanizados preferidos se unen al mismo epítipo y/o compiten con el BR2-22a para unirse a la LIV-1 humana. Los anticuerpos BR2-22a humanizados se unen al homólogo cyno de LIV-1 así como a LIV-1 humana. Los anticuerpos BR2-22a humanizados preferidos se unen esencialmente con la misma constante de asociación a la LIV-1 humana y de mono cynomolgus, ambas expresadas a partir de células CHO (dentro del error experimental) lo que permite y aumenta la precisión predictiva de los ensayos preclínicos en primates no humanos.

- 10 Los anticuerpos preferidos (tanto el BR2-14a humanizado como el BR2-22a humanizado) inhiben el cáncer (por ejemplo, el crecimiento de células, la metástasis y/o la letalidad de los organismos) como se muestra en las células cancerosas que se propagan en el cultivo, en un modelo animal o en un ensayo clínico. Se pueden formar modelos animales mediante la implantación de líneas celulares de tumores humanos que expresan LIV-1 en cepas de roedores inmunodeficientes apropiadas, por ejemplo, ratones desnudos atímicos o ratones SCID. Estas líneas celulares
- 15 tumorales pueden establecerse en huéspedes de roedores inmunodeficientes como tumores sólidos mediante inyecciones subcutáneas o como tumores diseminados mediante inyecciones intravenosas. Una vez establecidos dentro de un huésped, estos modelos de tumores pueden aplicarse para evaluar las eficacias terapéuticas de los anticuerpos anti-LIV-1 o formas conjugadas de los mismos como se describe en los ejemplos.

20 **B. Anticuerpos humanizados**

- Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado genéticamente en el que las CDR de un anticuerpo de "donante" no humano se injertan en secuencias de anticuerpos "aceptoras" humanas (véase, por ejemplo, Queen, US 5.530.101 y 5.585.089; Winter, US 5.225.539; Carter, US 6.407.213; Adair, US 5.859.205; y Foote, US 6.881.557). Las
- 25 secuencias de anticuerpos aceptoras pueden ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpos humanos maduros, un compuesto de dichas secuencias, una secuencia de consenso de secuencias de anticuerpos humanos o una secuencia de región de línea germinal. Una secuencia aceptadora preferida para la cadena pesada es la línea germinal V_H exón V_H1-2 (también conocida en la bibliografía como HV1-2) (Shin y col., 1991, EMBO J. 10:3641-3645) y para la región bisagra (J_H), exón J_H-6 (Mattila y col., 1995, Eur. J. Immunol. 25:2578-2582). Para la cadena ligera, una
 - 30 secuencia aceptadora preferida es el exón VK2-30 (también conocido en la bibliografía como KV2-30) y para la región bisagra el exón Jk-4 (Hieter y col., 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-1522). Por lo tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene algunas o todas las CDR total o sustancialmente de un anticuerpo donante y secuencias estructurales de región variable y regiones constantes, si están presentes, total o sustancialmente de secuencias de anticuerpos humanos. De manera similar, una cadena pesada humanizada tiene al menos una, dos y, por lo general,
 - 35 las tres CDR, total o sustancialmente de una cadena pesada de anticuerpo donante, y una secuencia estructural de la región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada, si están presentes, sustancialmente de la estructura de la región variable de la cadena pesada humana y secuencias de región constante. De manera similar, una cadena ligera humanizada tiene al menos una, dos y, por lo general, las tres CDR, total o sustancialmente de una
 - 40 cadena ligera de anticuerpo donante, y una secuencia estructural de la región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera, si están presentes, sustancialmente de la estructura de la región variable de la cadena ligera humana y secuencias de región constante. Además de nanocuerpos y dAbs, un anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Una CDR en un anticuerpo humanizado es sustancialmente de una CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando al menos el 60 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos correspondientes (según lo define Kabat) son idénticos entre las respectivas CDR. Las
 - 45 secuencias estructurales de región variable de una cadena de anticuerpo o la región constante de una cadena de anticuerpo son sustancialmente de una secuencia estructural de región variable humana o de una región constante humana, respectivamente, cuando al menos el 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de los residuos correspondientes definidos por Kabat son idénticos.
- 50 Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan las seis CDR (preferentemente como se define por Kabat) de un anticuerpo de ratón, también pueden hacerse con menos de todas las CDR (por ejemplo, al menos 3, 4 o 5) CDR de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis y col., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos y col., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi y col., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura y col., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000).
- 55
- Ciertos aminoácidos de los residuos estructurales de la región variable humana pueden seleccionarse para la sustitución en función de su posible influencia en la conformación de CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de dichas posibles influencias se realiza mediante el modelado, el examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares o la observación empírica de los efectos de sustitución o mutagénesis de aminoácidos
- 60 particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo estructural de región variable murina y un residuo estructural de región variable humana seleccionada, el aminoácido estructural humano puede ser sustituido por el aminoácido estructural equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

- 5 (1) se una de manera no covalente al antígeno directamente,
- (2) sea adyacente a una región CDR,
- (3) o de lo contrario, interactúe con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 6 Å de una región CDR); o
- 10 (4) medie la interacción entre las cadenas pesada y ligera.

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

También se describen variantes del anticuerpo humanizado HBLB en el que la región variable madura de la cadena pesada humanizada muestra al menos el 90 %, 95 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 10 y la región variable madura de la cadena ligera humanizada muestra al menos el 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15. Preferentemente, en dichos anticuerpos se retienen algunas o todas las retromutaciones en HBLB. En otras palabras, al menos 1, 2 o preferentemente las 3 posiciones de cadena pesada H29, H30 y H76 son ocupadas por I y E y N, respectivamente. De manera similar, la posición L36 es ocupada preferentemente por Y. Las regiones CDR de dichos anticuerpos humanizados son preferentemente sustancialmente idénticas a las regiones CDR de HBLB, que son las mismas que las del anticuerpo donante de ratón. Las regiones CDR pueden definirse por cualquier definición convencional (por ejemplo, Chothia) pero son preferentemente como las define Kabat. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las 3 CDR de la SEQ ID NO: 10 y las estructuras de región variable con al menos el 95 % de identidad con las estructuras de región variable de la SEQ ID NO: 10. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que comprende las 3 CDR de la SEQ ID NO: 15 y las estructuras de región variable con al menos el 95 % de identidad con estructuras de región variable de la SEQ ID NO: 15. En una realización adicional, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las 3 CDR de la SEQ ID NO: 10 y las estructuras de región variable con al menos el 95 % de identidad con las estructuras de región variable de la SEQ ID NO: 10, y una cadena ligera que comprende las 3 CDR de SEQ ID NO: 15 y estructuras de región variable con al menos el 95 % de identidad con las estructuras de región variable de la SEQ ID NO: 15.

En la medida en que los anticuerpos humanizados muestren cualquier variación con respecto al anticuerpo humanizado HBLB ejemplificado, una posibilidad para dicha variación adicional son las retromutaciones adicionales en las estructuras de región variable. También se puede realizar cualquiera o todas las posiciones retromutadas en otras regiones variables maduras de cadena ligera o pesada humanizada ejemplificada, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o las 9 de H27 ocupada por F, H28 ocupada por N, H48 ocupada por I, H66 ocupada por K, H67 ocupada por A, H71 ocupada por A, H76 ocupada por N, H93 ocupada por N y H94 ocupada por V en la cadena pesada y 1, 2, 3, 4 o las 5 de L37 ocupada por L, L39 ocupada por K, L45 ocupada por K y L46 ocupada por L en la cadena ligera. Sin embargo, dichas retromutaciones adicionales no se prefieren porque en general no mejoran la afinidad y la introducción de más residuos de ratón puede aumentar el riesgo de inmunogenicidad.

En el presente documento se describen formas humanizadas del anticuerpo BR2-22a de ratón que incluye tres regiones variables maduras de cadena pesada humanizadas ejemplificadas (HE, HF y HG) y dos cadenas ligeras humanizadas ejemplificadas (LF y LG) que se pueden combinar en diferentes permutaciones con una unión adecuada (véase la figura 21). De estas permutaciones, se prefiere HGLG (también conocida como hLIV22) porque tiene la mejor combinación de propiedades de unión (esencialmente la misma que el anticuerpo BR2-22a de ratón dentro del error experimental) y la menor cantidad de retromutaciones (siete).

También se describen variantes del anticuerpo humanizado HGLG en el que la región variable madura de la cadena pesada humanizada muestra al menos el 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 53 y la región variable madura de cadena ligera humanizada muestra al menos el 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 60. Preferentemente, en dichos anticuerpos se retienen algunas o todas las retromutaciones en HGLG. En otras palabras, al menos 1, 2, 3, 4 o preferentemente las 5 posiciones de cadena pesada H27, H29, H30, H76 y H94 son ocupadas por L, I, E, N y V (aquí, como en otras partes de este solicitud, se utiliza la numeración de

Kabat para describir las posiciones en las regiones variables de cadena pesada y ligera maduras). De estas retromutaciones, H94 es la de mayor contribución a la retención de la afinidad de unión y H76 es la de menor contribución. De manera similar, las posiciones L36 y L46 son ocupadas preferentemente por Y y P respectivamente. Las regiones CDR de dichos anticuerpos humanizados son preferentemente sustancialmente idénticas a las regiones

- 5 CDR de HGLG, que son las mismas que las del anticuerpo donante de ratón. Las regiones CDR pueden definirse por cualquier definición convencional (por ejemplo, Chothia) pero son preferentemente como las define Kabat. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las 3 CDR de la SEQ ID NO: 53 y las estructuras de región variable con al menos el 95 % de identidad con las estructuras de región variable de la SEQ ID NO: 53. En otra realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que comprende las 3 CDR' de la SEQ ID NO: 60 y las estructuras de región variable con al menos el 95 % de identidad con las estructuras de región variable de la SEQ ID NO: 60. En una realización adicional, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que comprende las 3 CDR de la SEQ ID NO: 53 y las estructuras de región variable con al menos el 95 % de identidad con las estructuras de región variable de la SEQ ID NO: 53, y una cadena ligera que comprende las 3 CDR de SEQ ID NO: 60 y estructuras de región variable con al menos el 95 % de identidad con las estructuras de región variable de la SEQ ID NO: 60.

En la medida en que los anticuerpos BR2-22a humanizados muestren cualquier variación con respecto al anticuerpo humanizado HGLG ejemplificado, una posibilidad para dicha variación adicional son las retromutaciones adicionales en las estructuras de región variable. También se puede realizar cualquiera o todas las posiciones retromutadas en otras regiones variables maduras de cadena ligera o pesada humanizadas ejemplificadas, es decir, 1, 2, 3, 4, 5 o las 6, de H28 ocupada por N, H48 ocupada por I, H66 ocupada por K, H67 ocupada por A, H71 ocupada por A, H93 ocupada por T en la cadena pesada y 1 o 2 de L37 ocupada por L37 ocupada por L, y L45 ocupada por K. Sin embargo, dichas retromutaciones adicionales no se prefieren porque en general no mejoran la afinidad y la introducción de más residuos de ratón puede aumentar el riesgo de inmunogenicidad.

- 25 Otra posible variación es sustituir ciertos residuos en las CDR del anticuerpo de ratón con los residuos correspondientes de las secuencias de CDR humanas, típicamente de las CDR de las secuenciasceptoras humanas utilizadas en el diseño de los anticuerpos humanizados ejemplificados. En algunos anticuerpos, solo una parte de las CDR, a saber, el subconjunto de residuos de CDR necesarias para la unión, denominadas SDR, se requieren para retener la unión en un anticuerpo humanizado. Los residuos de CDR que no entran en contacto con el antígeno y que no están en las SDR pueden identificarse según estudios previos (por ejemplo, los residuos H60-H65 en la CDR H2 a menudo no son necesarios), de regiones de CDR de Kabat que se encuentran fuera de los bucles hipervariables de Chothia (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), por modelado molecular y/o empíricamente o como se describe en Gonzales y col., Mol. Immunol. 41: 863 (2004). En dichos anticuerpos humanizados en posiciones en las que uno o más residuos de CDR del donante están ausentes o en los que se omite una CDR entera del donante, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (por numeración de Kabat) en la secuencia de anticuerpo aceptora. El número de dichas sustituciones deceptoras para aminoácidos de donante en las CDR de inclusión refleja un equilibrio de consideraciones competitivas. Dichas sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, en consecuencia, disminuir la inmunogenicidad potencial. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y preferentemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. En una variación adicional, uno o más residuos en una CDR de un anticuerpo BR2-22a humanizado (que de otro modo sería el mismo que la CDR del anticuerpo BR2-22a de ratón) se pueden reemplazar por los residuos correspondientes de una CDR del anticuerpo BR2-14a de ratón (o viceversa). Las posiciones para la sustitución dentro de las CDR y los aminoácidos para sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

Aunque no se prefieren, se pueden hacer otras sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, en residuos estructurales que no están en contacto con las CDR, o incluso algunos aminoácidos potenciales de residuos en contacto con CDR dentro de las CDR. A menudo, los reemplazos realizados en la variante de secuencias humanizadas son conservadores con respecto a los aminoácidos HBLB reemplazados (en el caso de BR2-14a humanizados) o aminoácidos HGLG (en el caso de BR2-22 humanizado). Preferentemente, los reemplazos relativos a HBLB o HGLG (sean o no conservadores) no tienen un efecto sustancial sobre la afinidad o potencia de unión del mAb humanizado, es decir, su capacidad para unirse a la LIV-1 humana e inhibir el crecimiento de células cancerosas.

- 55 Las variantes típicamente difieren de las secuencias de región variable madura de cadena pesada y ligera de HBLB (hLIV14) o HGLG (hLIV22) en un número pequeño (por ejemplo, típicamente no más de 1, 2, 3, 5 o 10 tanto en la región variable madura de cadena ligera o de cadena pesada o ambas) de reemplazos, eliminaciones o inserciones.

C. Selección de región constante

60

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos humanizados pueden enlazarse a al menos una porción de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, de si se desea la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad dependiente del complemento. Por ejemplo, los isótopos humanos IgG1 e IgG3 tienen una fuerte citotoxicidad dependiente del complemento, el isotipo humano IgG2 una débil citotoxicidad dependiente del complemento y la IgG4 humana carece de citotoxicidad dependiente del complemento. Las IgG1 e IgG3 humanas también inducen funciones efectoras mediadas por células más fuertes que las IgG2 e IgG4 humanas. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden expresarse como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv o como anticuerpos monocatenarios en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera se enlazan a través de un espaciador.

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

Uno o varios aminoácidos en el extremo amino o carboxi de la cadena ligera y/o pesada, como la lisina C-terminal de la cadena pesada, pueden faltar o derivarse en una proporción o en todas las moléculas. Se pueden realizar sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora, como la citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC (véase, por ejemplo, Winter y col., patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; Tso y col., patente de Estados Unidos n.º 5.834.597; y Lazar y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006) o para prolongar la vida media en humanos (véase, por ejemplo, Hinton y col., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

La sustitución ejemplar incluye la sustitución de aminoácidos del aminoácido nativo por un residuo de cisteína que se introduce en la posición de aminoácidos 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 o 332, preferentemente una mutación S239C en un isotipo de IgG1 humana (US 2010/0158909). La presencia de un residuo de cisteína adicional permite la formación de enlaces disulfuro intercatenarios. Dicha formación de enlaces disulfuro intercatenarios puede causar un impedimento estérico, reduciendo así la afinidad de la interacción vinculante de región Fc a FcγR. El (los) residuo(s) de cisteína introducido(s) en o cerca de la región Fc de una región constante de IgG también pueden servir como sitios para la conjugación con agentes terapéuticos (es decir, acoplando fármacos citotóxicos utilizando reactivos específicos de tiol, como los derivados de maleimida de fármacos). La presencia de un agente terapéutico causa un impedimento estérico, reduciendo así la afinidad de la interacción vinculante de región Fc a FcγR. Otras sustituciones en cualquiera de las posiciones 234, 235, 236 y/o 237 reducen la afinidad por los receptores Fcγ, en particular, el receptor FcγRI (véase, por ejemplo, el documento US 6.624.821, US 5.624.821.)

La vida media *in vivo* de un anticuerpo también puede afectar sus funciones efectoras. La vida media de un anticuerpo se puede aumentar o disminuir para modificar sus actividades terapéuticas. FcRn es un receptor que es estructuralmente similar al antígeno MHC de clase I que se asocia de manera no covalente con la β2-microglobulina. FcRn regula el catabolismo de las IgG y su transcitosis a través de tejidos (Ghetie y Ward, 2000, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766; Ghetie y Ward, 2002, Immunol. Res. 25:97-113). La interacción IgG-FcRn tiene lugar a un pH de 6,0 (pH de las vesículas intracelulares) pero no a un pH de 7,4 (pH de la sangre); esta interacción permite que las IgG sean recicladas nuevamente para la circulación (Ghetie y Ward, 2000, Ann. Rev. Immunol. 18:739-766; Ghetie y Ward, 2002, Immunol. Res. 25:97-113). La región en la IgG1 humana involucrada en la unión de FcRn se ha mapeado (Shields y col., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Las sustituciones de alanina en las posiciones Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 o Asn434 de la IgG1 humana mejoran la unión a FcRn (Shields y col., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Las moléculas IgG1 que albergan estas sustituciones tienen vidas medias en suero más largas. En consecuencia, estas moléculas de IgG1 modificadas pueden ser capaces de llevar a cabo sus funciones efectoras y, por lo tanto, ejercer su eficacia terapéutica, durante un período de tiempo más largo en comparación con la IgG1 no modificada. Otras sustituciones ejemplares para aumentar la unión a FcRn incluyen una Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428. La numeración de la UE se utiliza para todas las posiciones en la región constante.

Los oligosacáridos unidos covalentemente a la Asn297 conservada están implicados en la capacidad de la región Fc de una IgG para unirse a FcγR (Lund y col., 1996, J. Immunol. 157:4963-69; Wright y Morrison, 1997, Trends Biotechnol. 15:26-31). La ingeniería de esta glicoforma en IgG puede mejorar significativamente la ADCC mediada por IgG. Adición de modificaciones de bisección de N-acetilglucosamina (Umana y col., 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies y col., 2001, Biotech. Bioeng. 74:288-94) a esta glicoforma o eliminación de fucosa (Shields y col., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-40; Shinkawa y col., 2003, J. Biol. Chem. 278:6591-604; Niwa y col., 2004, Cancer Res. 64:2127-33) de esta glicoforma hay dos ejemplos de ingeniería de IgG Fc que mejora la unión entre IgG Fc y FcγR, mejorando así la actividad de ADCC mediada por Ig.

Una sustitución sistémica de aminoácidos expuestos a solventes de la región Fc de IgG1 humana ha generado variantes de IgG con afinidades de unión a FcγR alteradas (Shields y col., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Cuando se compara con la IgG1 parental, un subconjunto de estas variantes que involucran sustituciones en Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 o Ser298/Glu333/Lys334 para Ala demuestran un aumento en la afinidad de unión hacia FcγR y en la actividad de ADCC (Shields y col., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604; Okazaki y col., 2004, J. Mol. Biol. 336:1239-49).

La actividad de fijación del complemento de los anticuerpos (tanto la unión de C1q como la actividad de CDC) se puede mejorar mediante sustituciones en Lys326 y Glu333 (Idusogie y col., 2001, J. Immunol. 166:2571-2575). Las mismas sustituciones en un esqueleto de IgG2 humana pueden convertir un isotipo de anticuerpo que se une poco a C1q y es extremadamente deficiente en la actividad de activación del complemento a uno que puede unirse a C1q y mediar CDC (Idusogie y col., 2001, J. Immunol. 166:2571-75). Varios otros procedimientos también se han aplicado para mejorar la actividad de fijación del complemento de los anticuerpos. Por ejemplo, el injerto de una pieza de la cola del terminal carboxilo de 18 aminoácidos de la IgM en el extremo carboxilo de la IgG aumenta enormemente su actividad de CDC. Esto se observa incluso con IgG4, que normalmente no tiene actividad de CDC detectable (Smith y col., 1995, J. Immunol. 154:2226-36). Además, al sustituir Ser444 ubicado cerca del carboxi-terminal de la cadena pesada de IgG1 con Cys, se indujo la dimerización de cola a cola de IgG1 con un aumento de 200 veces de la actividad de CDC con respecto a la IgG1 monomérica (Shopes y col., 1992, J. Immunol. 148:2918-22). Además, un constructo de diacuerpo biespecífico con especificidad por C1q también confiere actividad de CDC (Kontermann y col., 1997, Nat. Biotech. 15:629-31).

La actividad del complemento puede reducirse mutando al menos uno de los residuos de aminoácidos 318, 320 y 322 de la cadena pesada a un residuo que tiene una cadena lateral diferente, como Ala. Otros residuos no iónicos sustituidos con alquilo, como Gly, Ile, Leu o Val, o dichos residuos no polares aromáticos como Phe, Tyr, Trp y Pro en lugar de cualquiera de los tres residuos también reducen o anulan la unión de C1q. Ser, Thr, Cys y Met se pueden utilizar en los residuos 320 y 322, pero no en 318, para reducir o anular la actividad de unión de C1q. El reemplazo del residuo 318 (Glu) por un residuo polar puede modificar pero no anular la actividad de unión de C1q. Reemplazar el residuo 297 (Asn) con Ala da como resultado la eliminación de la actividad lítica, pero solo reduce ligeramente la afinidad (aproximadamente tres veces más débil) por C1q. Esta alteración destruye el sitio de glicosilación y la presencia de carbohidratos que se requieren para la activación del complemento. Cualquier otra sustitución en este sitio también destruye el sitio de glicosilación. Las siguientes mutaciones y cualquier combinación de las mismas también reducen la unión de C1q: D270A, K322A, P329A y P311S (véase el documento WO 06/036291).

La referencia a una región constante humana incluye una región constante con cualquier alotipo natural o cualquier permutación de residuos que ocupe posiciones polimórficas en alotipos naturales. Además, pueden estar presentes hasta 1, 2, 5 o 10 mutaciones en relación con una región constante humana natural, como las indicadas anteriormente para reducir la unión del receptor Fcγgamma o aumentar la unión a FcγRN.

40 **D. Expresión de anticuerpos recombinantes**

Los anticuerpos humanizados se producen típicamente por expresión recombinante. Los constructos de polinucleótidos recombinantes típicamente incluyen una secuencia de control de expresión enlazada operativamente a las secuencias codificantes de cadenas de anticuerpos, incluidas las regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas. Preferentemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado al huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

Las células de mamífero son un huésped preferido para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas. Véase Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). Se han desarrollado varias líneas de células hospedadoras adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas intactas, e incluyen líneas de células CHO (por ejemplo, DG44), varias líneas de células COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas de producción sin anticuerpos, incluyendo Sp2/0 y NS0. Preferentemente, las células no son humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen y col., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional. Las secuencias de control de expresión preferidas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino y similares. Véase Co y col., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Una vez expresados, los anticuerpos pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos estándar de la técnica, incluida la purificación por HPLC, la cromatografía en columna, la electroforesis en gel y similares (véase en general, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

5

IV. Ácidos nucleicos

En el presente documento se describen los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras humanizadas descritas anteriormente. Típicamente, los ácidos nucleicos también codifican un péptido de señal fusionado con las cadenas pesadas y ligeras maduras. Las secuencias de codificación en ácidos nucleicos pueden estar en un enlace operable con secuencias reguladoras para asegurar la expresión de las secuencias de codificación, tales como un promotor, potenciador, sitio de unión al ribosoma, señal de terminación de transcripción y similares. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras pueden aparecer en forma aislada o pueden clonarse en uno o más vectores. Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante síntesis en estado sólido o PCR de oligonucleótidos superpuestos. Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras pueden unirse como un ácido nucleico contiguo, por ejemplo, dentro de un vector de expresión, o pueden estar separados, por ejemplo, cada uno clonado en su propio vector de expresión.

20

V. Conjugados farmacológicos de anticuerpo

Los anticuerpos anti-LIV-1 pueden conjugarse con fracciones citotóxicas o citostáticas (incluidas sales farmacéuticamente compatibles de las mismas) para formar un conjugado farmacológico de anticuerpo (ADC). Los fracciones particularmente adecuados para la conjugación con anticuerpos son agentes citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos), enzimas convertidoras de profármacos, isótopos o compuestos radiactivos o toxinas (estas fracciones se denominan colectivamente como un agente terapéutico). Por ejemplo, un anticuerpo anti-LIV-1 puede conjugarse con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico o una toxina (por ejemplo, un agente citostático o agente citocidal como, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina pseudomonas o toxina diftérica).

Un anticuerpo anti-LIV-1 puede conjugarse con una enzima de conversión de profármaco. La enzima de conversión de profármaco se puede fusionar de forma recombinante con el anticuerpo o conjugar químicamente con el mismo utilizando procedimientos conocidos. Las enzimas de conversión de profármacos ejemplares son carboxipeptidasa G2, beta-glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitroreductasa y carboxipeptidasa A.

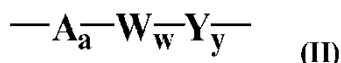
Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos con proteínas, y en particular con anticuerpos, son bien conocidas. (Véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld y col. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (Robinson y col. eds., Marcel Dekker, Inc., 2.^a ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera y col. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin y col. eds., Academic Press, 1985); y Thorpe y col., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. Véase también, por ejemplo, PCT publication WO 89/12624.)

El agente terapéutico puede conjugarse de una manera que reduce su actividad a menos que se escinda del anticuerpo (por ejemplo, por hidrólisis, por degradación del anticuerpo o por un agente de escisión). Dicho agente terapéutico está unido al anticuerpo con un enlazador escindible que es sensible a la escisión en el entorno intracelular de la célula cancerosa que expresa LIV-1 pero no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, de manera que el conjugado se escinde del anticuerpo cuando está internalizado por la célula cancerosa que expresa LIV-1 (por ejemplo, en el entorno endosómico o, por ejemplo, en virtud de la sensibilidad al pH o la sensibilidad a la proteasa, en el entorno lisosomal o en el entorno caveolar).

Típicamente, el ADC comprende una región enlazadora entre el agente terapéutico y el anticuerpo anti-LIV-1. Como se ha indicado anteriormente, típicamente, el enlazador se puede escindir en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del enlazador libera el agente terapéutico del anticuerpo en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador peptídico que es escindido por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, que incluye una proteasa lisosomal o endosomal. Típicamente, el enlazador peptídico tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o una longitud de al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Los más típicos son los enlazadores peptídico que son escindibles por enzimas que

- están presentes en las células que expresan LIV-1. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador peptídico que puede ser escindido por la catepsina-B de proteasa dependiente de tiol, que se expresa altamente en tejido canceroso (por ejemplo, un enlazador que comprende un péptido Phe-Leu o un Gly-Phe-Leu-Gly). Otros enlazadores de este tipo se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6.214.345. En realizaciones específicas, el enlazador
- 5 peptídico escindible por una proteasa intracelular comprende un enlazador Val-Cit o un dipéptido Phe-Lys (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.214.345, que describe la síntesis de doxorrubicina con el enlazador Val-Cit). Una ventaja de utilizar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa típicamente cuando está conjugado y las estabilidades en suero de los conjugados son típicamente altas.
- 10 El enlazador escindible puede ser sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Típicamente, el enlazador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil al ácido que es hidrolizable en el lisosoma (*por ejemplo*, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cisaconítica, ortoéster, acetal, cetel o similares). (Véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville y col., 1989, Biol. Chem.
- 15 264:14653-14661.) Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, como las de la sangre, pero son inestables por debajo de un pH de 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de un enlace de acilhidrazona (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.622.929)).
- 20 Otros enlazadores son escindibles en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador disulfuro). Los enlazadores disulfuro incluyen aquellos que pueden formarse utilizando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxycarbonil-alfametil-alfa-(2-piridilditio)tolueno), SPDB y SMPT. (Véase, por ejemplo, Thorpe y col., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak y col., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of
- 25 Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también la patente de Estados Unidos n.º 4.880.935.)
- El enlazador también puede ser un enlazador de malonato (Johnson y col., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), un enlazador de maleimidobenzóilo (Lau y col., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304) o un análogo de 3'-N-amida (Lau y col., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10): 1305-12).
- 30 El enlazador también puede ser un enlazador no escindible, tal como un enlazador maleimido-alquileo o maleimidaarilo que está directamente unido al agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco). Se libera un enlazador de fármaco activo por degradación del anticuerpo.
- 35 Típicamente, el enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, lo que significa que no más de aproximadamente el 20 %, típicamente no más de aproximadamente el 15 %, más típicamente no más de aproximadamente el 10 %, e incluso más típicamente no más de aproximadamente el 5 %, no más de aproximadamente el 3 % o no más de aproximadamente el 1 % de los enlazadores en una muestra del ADC se escinde cuando el ADC está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Si un enlazador no es
- 40 sustancialmente sensible al entorno extracelular se puede determinar, por ejemplo, incubando independientemente con plasma tanto (a) el ADC (la "muestra de ADC") y (b) una cantidad molar igual de anticuerpo no conjugado o agente terapéutico (la "muestra de control") durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y luego comparando la cantidad de anticuerpo no conjugado o agente terapéutico presente en la muestra de ADC con la presente en la muestra de control, como la medida, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.
- 45 El enlazador también puede promover la internalización celular. El enlazador puede promover la internalización celular cuando se conjugua con el agente terapéutico (*es decir*, en el medio de la fracción de enlazador - agente terapéutico del ADC o derivado de ADC como se describe en el presente documento). Alternativamente, el enlazador puede promover la internalización celular cuando se conjugua tanto con el agente terapéutico como con el anticuerpo anti-LIV-
- 50 1 (*es decir*, en el medio del ADC tal como se describe en el presente documento).

Una variedad de enlazadores que se pueden utilizar con las presentes composiciones se describe en el documento WO 2004-010957 y tienen la forma



55

donde:

-A- es una unidad bastidor;

a es 0 o 1;

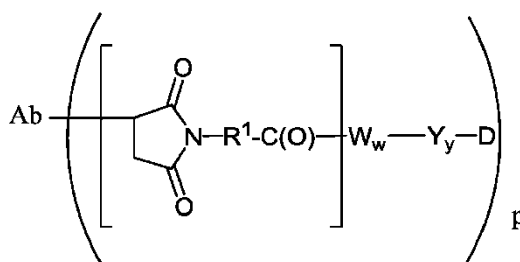
cada -W- es independientemente una unidad de aminoácidos;

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

-Y- es una unidad espaciadora; y

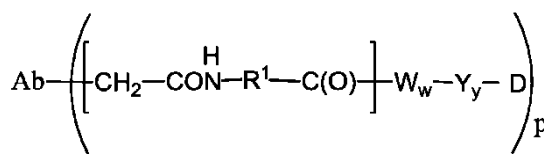
5 y es 0, 1 o 2.

Las unidades bastidor representativas se representan dentro de los corchetes de las fórmulas (Ia) e (Ib; véase a continuación), donde A, -W-, -Y-, -D, w e y son como definidos anteriormente y R¹ se selecciona de entre -C₁-C₁₀-alquileo-, -C₃-C₈-carbociclo-, -O-(C₁-C₈ alquil)-, -arileno-, -C₁-C₁₀ alquileo-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀ alquileo-, -C₁-C₁₀ alquileo-(C₃-C₈carbociclo)-, -C₃-C₈carbociclo-C₁-C₁₀ alquileo-, -C₃-C₈ heterociclo-, -C₁-C₁₀ alquileo-(C₃-C₈ heterociclo)-, -C₃-C₈ heterociclo-C₁-C₁₀ alquileo-, -(CH₂CH₂O)_r-, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es un número entero que varía entre 1-10. Ab es el anticuerpo.



(Ia)

15



(Ib)

La carga del fármaco está representada por p, el número de moléculas enlazadoras de fármaco por anticuerpo. Dependiendo del contexto, p puede representar el número promedio de moléculas enlazadoras de fármaco por anticuerpo, también referido a la carga promedio de fármaco. P varía de 1 a 20 y es preferentemente de 1 a 8. En algunas realizaciones preferidas, cuando p representa la carga promedio de fármaco, p varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En algunas realizaciones, p es aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4 o aproximadamente 5. El número promedio de fármacos por anticuerpo en una preparación se puede caracterizar por medios convencionales, como la espectroscopia de masas, el ensayo ELISA y la HPLC.

La unidad de aminoácidos (-W-), si está presente, vincula la unidad bastidor (-A-) a la unidad espaciadora (-Y-) si la unidad espaciadora está presente, y vincula la unidad bastidor al agente citotóxico o citostático (unidad farmacológica; D) si la unidad espaciadora está ausente.

Si está presente, -W_w- es preferentemente una unidad dipeptídica, tripeptídica, tetrapeptídica, pentapeptídica, hexapeptídica, heptapeptídica, octapeptídica, nonapeptídica, decapeptídica, undecapeptídica o dodecapeptídica.

La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, vincula una unidad de aminoácido a la unidad farmacológica. Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmolativas y no autoinmolativas. Una unidad espaciadora no autoinmolativa es aquella en la que parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida a la unidad farmacológica después de la escisión enzimática de una unidad de aminoácido del conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco anti-LIV-1 o el compuesto de enlazador de fármaco. Los ejemplos de una unidad espaciadora no autoinmolativa incluyen una unidad espaciadora (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina. Cuando un conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco anti-LIV-1 que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina sufre una escisión enzimática a través de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, se escinde una fracción de glicina-glicina-fármaco o una fracción de glicina-fármaco de Ab-A_a-W_w-. Para liberar el fármaco, debe tener lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana para escindir el enlace de la unidad glicina-fármaco.

Alternativamente, un conjugado farmacológico de anticuerpo anti-LIV-1 que contiene una unidad espaciadora autoinmolativa puede liberar el fármaco (D) sin la necesidad de una etapa de hidrólisis separada. En algunas de estas

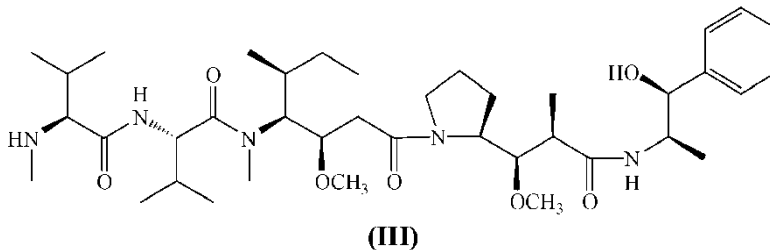
- realizaciones, -Y- es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) que se enlaza a -W- a través del átomo de nitrógeno del grupo PAB, y se conecta directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Otros ejemplos de espaciadores autoinmolativos incluyen compuestos aromáticos que son equivalentes electrónicamente al grupo PAB, como los derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase Hay y col., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237 por ejemplo) orto o para-aminobencilacetales. Se pueden utilizar espaciadores que se someten a una ciclación fácil bajo hidrólisis de enlace amida, como las amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodriguez y col., 1995, Chemistry Biology 2:223), sistemas de anillo de biciclo [2.2.1] y de biciclo [2.2.2] correctamente sustituidos (Storm y col., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry y col., 1990, J. Org. Chem. 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que se sustituyen en la posición α de la glicina (Kingsbury, y col., 1984, J. Med. Chem. 27:1447) también son ejemplos de estrategias espaciadoras autoinmolativas que se pueden aplicar a los conjugados de anticuerpo-enlazador-fármaco anti-LIV-1. Alternativamente, la unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificada, que se puede utilizar para incorporar fármacos adicionales.
- 15 Las clases útiles de agentes citotóxicos para conjugar con anticuerpos anti-LIV-1 incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, sensibilizadores de la quimioterapia o similares. Otras clases ejemplares de agentes citotóxicos incluyen antraciclinas, auristatinas, camptotecinas, duocarmicinas, etopósidos, maitansinoides y alcaloides de la vinca. Algunos agentes citotóxicos ejemplares incluyen auristatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), aglutinantes del surco menor del ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), alcaloides de la vinca, doxorubicina, morfolino-doxorubicina y cianomorfolino-doxorubicina.

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

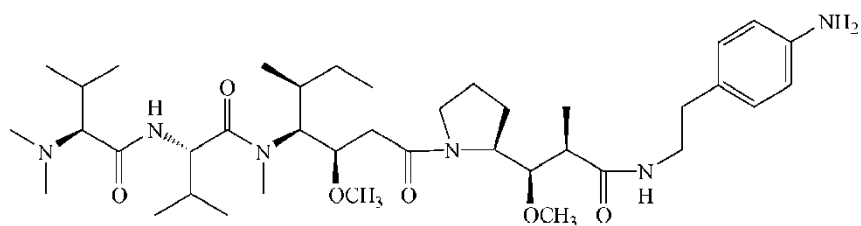
El agente citotóxico también puede ser una auristatina. La auristatina puede ser un derivado de la auristatina E, por ejemplo, un éster formado entre la auristatina E y un ácido ceto. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y la estructura de varias auristatinas se describen, por ejemplo, en el documento US 2005-0238649 y en el documento US2006-0074008.

El agente citotóxico puede ser un agente de unión al surco menor del ADN. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.130.237.) Por ejemplo, el agente de unión al surco menor puede ser un compuesto CBI o un enediina (por ejemplo, caliqueamicina).

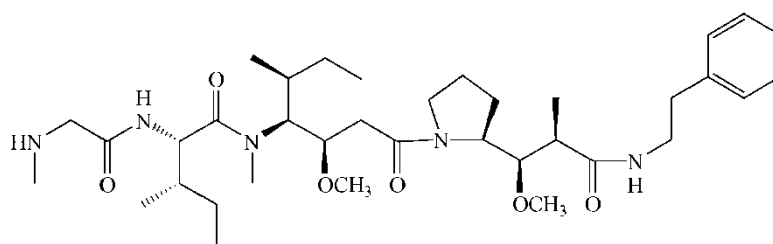
El agente citotóxico o citostático puede ser un agente anti-tubulina. Los ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y auristatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). (Las auristatinas ejemplares se muestran a continuación en las fórmulas III-XIII). Otros agentes antitubulina adecuados incluyen, por ejemplo, derivados de baccatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatina, discodermolida y eleuterobina.



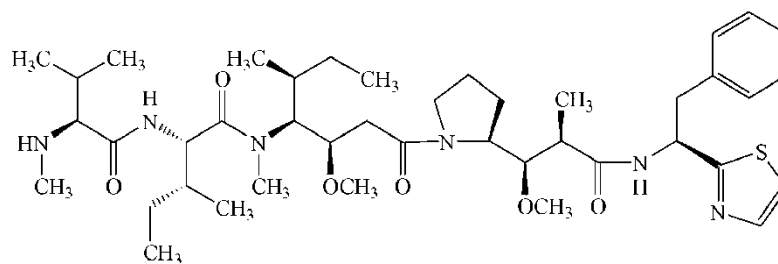
45



(IV)

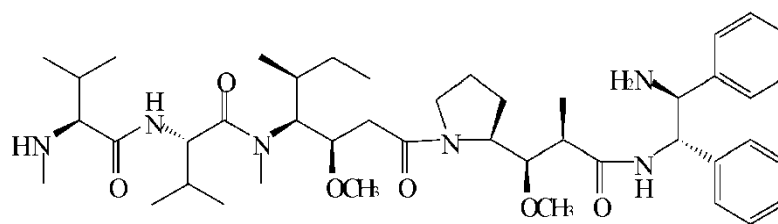


(V)

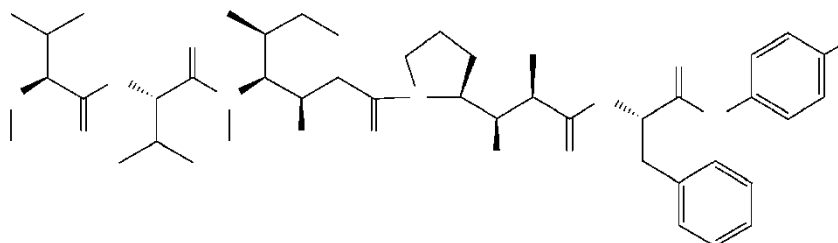


(VI)

5

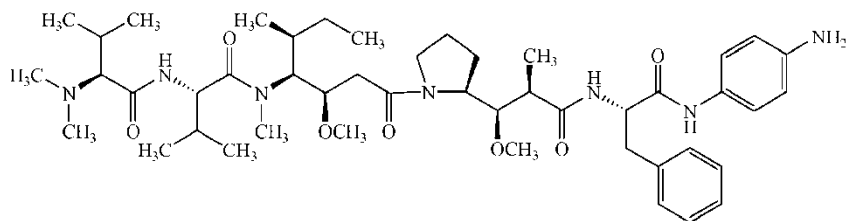


(VII)

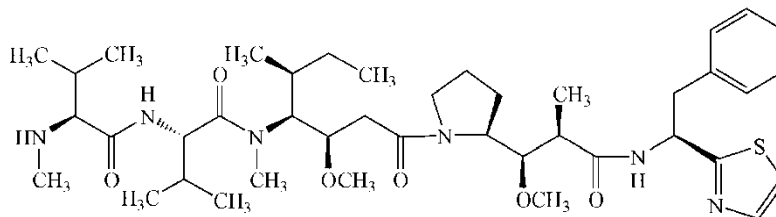


(VIII)

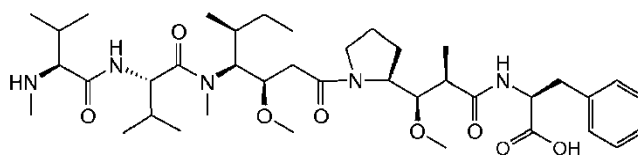
10



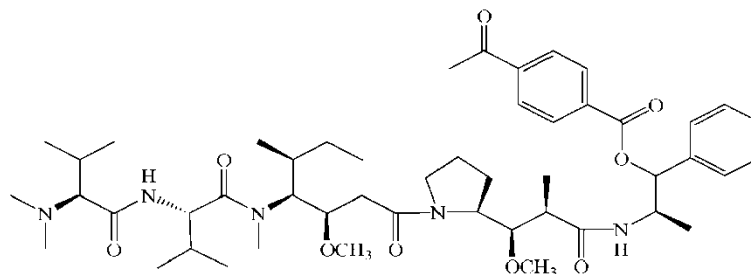
(IX)



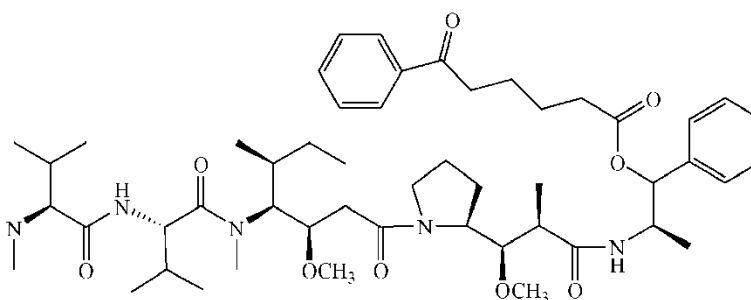
(X)



(XI)



(XII)



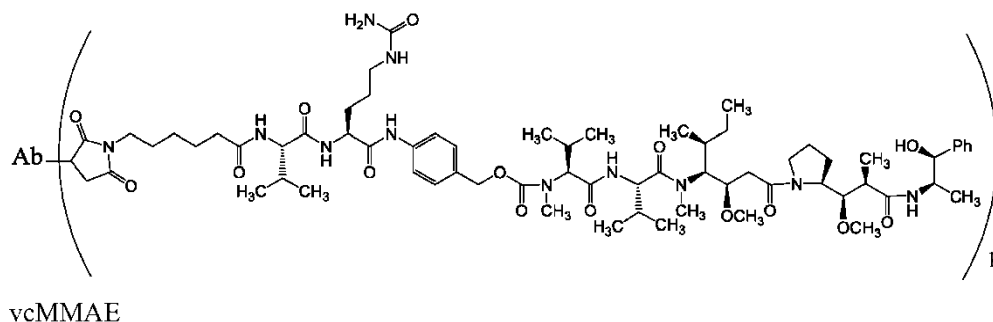
(XIII)

5

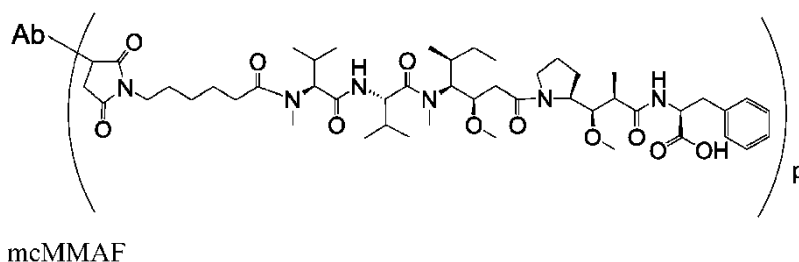
10

El agente citotóxico puede ser un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, el maitansinoide puede ser una maitansina o una maitansina que contiene un enlazador de fármacos como DM-1 o DM-4 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari y col., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

Los conjugados farmacológicos de anticuerpo ejemplares incluyen conjugados farmacológicos de anticuerpo vcMMAE y mcMMAF de la siguiente manera, donde p y Ab son como se han descrito anteriormente en el presente documento:



5



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

10 VI. Otros anticuerpos para LIV-1

Además de las formas humanizadas de los anticuerpos BR2-14a y BR2-22a descritas anteriormente, se pueden utilizar otros anticuerpos que se unen a un dominio extracelular de LIV-1 en algunos de los procedimientos descritos en el presente documento, en particular el tratamiento de los cánceres de mama triple negativos. Una colección de anticuerpos de ratón para LIV-1 se describe en el documento US20080175839. Estos anticuerpos incluyen 1.1F10, 1.7A4, BR2-10b, BR2-11a, BR2-13a, BR2-14a, BR2-15a, BR2-16a, BR2-17a, BR2-18a, BR2-19a, BR2-20a, BR2-21a, BR2-22a, BR2-23a, BR2-24a y BR2-25a, de los cuales se prefiere el BR2-19a producido por el hibridoma con n.º de acceso ATCC PTA-5706 o el BR2-23a producido por el hibridoma con n.º de acceso ATCC PTA-5707 además de BR2-14a y BR2-22a. Las formas humanizadas, quiméricas o bañadas de estos anticuerpos pueden hacerse mediante procedimientos convencionales que se resumen a continuación.

Otros anticuerpos para LIV-1 pueden hacerse nuevamente mediante la inmunización con LIV-1 o uno o más de los dominios extracelulares de la misma. La producción de otros anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murinos, cobayas, primates, conejos o ratas, contra un inmunógeno puede realizarse tal como ha sido descrito por Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988). Dicho inmunógeno puede obtenerse a partir de una fuente natural, por síntesis de péptidos o por expresión recombinante.

Se pueden hacer formas humanizadas, quiméricas o recubiertas de anticuerpos no humanos. La metodología general para producir anticuerpos humanizados se describe en Queen, US 5.530.101 y 5.585.089; Winter, US 5.225.539; Carter, US 6.407.213; Adair, US 5.859.205; y Foote, US 6.881.557). Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que las regiones variables maduras de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo no humano (por ejemplo, un ratón) se combinan con las regiones constantes de las cadenas ligeras y pesadas humanas. Dichos anticuerpos retienen sustancial o totalmente la especificidad de unión del anticuerpo de ratón, y son aproximadamente dos tercios de la secuencia humana. Un anticuerpo recubierto es un tipo de anticuerpo humanizado que retiene algunas y generalmente todas las CDR y algunos de los residuos estructurales de la región variable no humana de un anticuerpo no humano, pero reemplaza otros residuos estructurales de la región variable que pueden contribuir a epítopos de células B o T, por ejemplo, residuos expuestos (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991) con residuos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo humano. El resultado es un anticuerpo en el que las CDR son total o sustancialmente de un anticuerpo no humano y las estructuras de región variable del anticuerpo no humano se hacen más parecidas a las humanas mediante las sustituciones.

Los anticuerpos humanos contra LIV-1 pueden proporcionarse mediante una variedad de técnicas que se describen a continuación. Los procedimientos para producir anticuerpos humanos incluyen el procedimiento de trioma de Oestberg y col., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, patente de Estados Unidos n.º 4.634.664; y Engleman y col., patente de Estados Unidos 4.634.666; el uso de ratones transgénicos que incluyen genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Lonberg y col., WO93/12227 (1993); US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) y procedimientos de visualización en fagos (véase, por ejemplo, Dower y col., WO 91/17271 y McCafferty y col., WO 92/01047, US 5.877.218, US 5.871.907, US 5.858.657, US 5.837.242, US 5.733.743 y US 5.565.332).

Cualquiera de los anticuerpos puede seleccionarse para que tenga la misma especificidad de epítipo o de superposición a un anticuerpo ejemplar, como el anticuerpo BR2-14a, mediante un ensayo de unión competitiva o de otro tipo.

15 VII. Aplicaciones terapéuticas

Los anticuerpos humanizados de la invención, solos o como conjugados farmacológicos de anticuerpo LIV-1 de los mismos, pueden utilizarse para tratar el cáncer. Algunos de estos cánceres muestran niveles detectables de LIV-1 medidos a nivel de la proteína (por ejemplo, mediante inmunoensayo utilizando uno de los anticuerpos ejemplificados) o a nivel de ARNm. Algunos de estos cánceres muestran niveles elevados de LIV-1 en relación con el tejido no canceroso del mismo tipo, preferentemente del mismo paciente. Un nivel ejemplar de LIV-1 en células cancerosas susceptibles de tratamiento es de 5000-150000 moléculas de LIV-1 por célula, aunque se pueden tratar niveles más altos o más bajos. Opcionalmente, un nivel de LIV-1 en un cáncer se mide antes de realizar el tratamiento.

Los ejemplos de cánceres asociados con la expresión de LIV-1 y susceptibles de tratamiento incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, carcinoma cervical, hepático, gástrico, renal y de células escamosas (por ejemplo, vejiga, cabeza, cuello y pulmón), cánceres de piel, por ejemplo, melanoma, carcinoma de células pulmonares pequeñas o carcinoide pulmonar. El tratamiento se puede aplicar a pacientes con tumores primarios o metastásicos de estos tipos. El tratamiento también se puede aplicar a pacientes que son refractarios a los tratamientos convencionales (por ejemplo, hormonas, tamoxifeno, herceptina) o que han recaído después de una respuesta a dichos tratamientos. Los procedimientos también se pueden utilizar en los cánceres de mama triple negativos. Un cáncer de mama triple negativo es un término de la técnica para un cáncer que carece de receptores de estrógeno y progesterona detectables y que carece de la sobreexpresión de HER2/neu cuando se tiñe con un anticuerpo para cualquiera de estos receptores, tal como se describe en los ejemplos. La tinción se puede realizar en relación con un anticuerpo de control irrelevante y la falta de expresión mostrada a partir de un nivel de fondo de esfuerzo igual o similar al del control dentro del error experimental. Del mismo modo, la falta de sobreexpresión se muestra al teñir al mismo nivel o similar dentro de un error experimental de tejido mamario no canceroso, preferentemente obtenido del mismo paciente. De manera alternativa o adicional, los cánceres de mama nativos triples se caracterizan por la falta de respuesta a las hormonas que interactúan con estos receptores, el comportamiento agresivo y un patrón distinto de metástasis.

Los anticuerpos hLIV14 pueden utilizarse para tratar los cánceres que expresan LIV-1. En una realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de mama que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de próstata que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un melanoma que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de ovario que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de endometrio que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer cervical que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de hígado que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer gástrico que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de riñón que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con carcinomas de células escamosas que expresan LIV-1 (por ejemplo, cáncer de vejiga, cabeza, cuello y pulmón). En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de mama que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un cáncer de piel que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV14 para tratar a un sujeto con un carcinoma de células pulmonares pequeñas o carcinoide pulmonar que expresan LIV-1.

Los anticuerpos hLIV22 pueden utilizarse para tratar los cánceres que expresan LIV-1. En una realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de mama que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de próstata que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un melanoma que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de ovario que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza

- un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de endometrio que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer cervical que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de hígado que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer gástrico que expresa LIV-1. En otra realización,
- 5 se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de riñón que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con carcinomas de células escamosas que expresan LIV-1 (por ejemplo, cáncer de vejiga, cabeza, cuello y pulmón). En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de mama que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a un sujeto con un cáncer de piel que expresa LIV-1. En otra realización, se utiliza un anticuerpo hLIV22 para tratar a
- 10 un sujeto con un carcinoma de células pulmonares pequeñas o carcinoide pulmonar que expresan LIV-1. Esta solicitud proporciona la primera descripción en la que la proteína LIV-1 se expresa en la superficie de las células del melanoma. Por lo tanto, los anticuerpos que se unen a LIV-1 se pueden utilizar para tratar pacientes que están afectados por melanomas que expresan LIV-1. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, hLIV14 y hLIV22, pero no se limitan a los anticuerpos descritos en el presente documento.
- 15 Los anticuerpos humanizados, solos o como conjugados de los mismos, se administran en un régimen eficaz que significa una dosificación, vía de administración y frecuencia de administración que retrasa el inicio, reduce la gravedad, inhibe un mayor deterioro y/o mejora al menos un signo o síntoma del cáncer. Si un paciente ya sufre de cáncer, el régimen se puede denominar como un régimen terapéuticamente eficaz. Si el paciente tiene un riesgo
- 20 elevado de cáncer en relación con la población general, pero aún no presenta síntomas, el régimen se puede denominar como un régimen profilácticamente eficaz. En algunos casos, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede observar en un paciente individual en relación con los controles históricos o la experiencia pasada en el mismo paciente. En otros casos, la eficacia terapéutica o profiláctica puede demostrarse en un ensayo clínico o preclínico en una población de pacientes tratados en relación con una población de control de pacientes no tratados.1
- 25 Las dosificaciones ejemplares para un anticuerpo monoclonal son de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg del peso corporal del paciente, más típicamente de 1 mg/kg a 30 mg/kg, de 1 mg/kg a 20 mg/kg, de 1 mg/kg a 15 mg/kg, de 1 mg/kg a 12 mg/kg o de 1 mg/kg a 10 mg/kg 1 o de 2 mg/kg a 30 mg/kg, de 2 mg/kg a 20 mg/kg, de 2 mg/kg a 15 mg/kg, de 2 mg/kg a 12 mg/kg o de 2 mg/kg a 10 mg/kg o de 3 mg/kg a 30 mg/kg, de 3 mg/kg a 20 mg/kg, de 3 mg/kg a 15 mg/kg,
- 30 de 3 mg/kg a 12 mg/kg o de 3 mg/kg a 10 mg/kg. Las dosis ejemplares para un anticuerpo monoclonal o conjugados farmacológicos de anticuerpo del mismo son de 1 mg/kg a 7,5 mg/kg o de 2 mg/kg a 7,5 mg/kg o de 3 mg/kg a 7,5 mg/kg del peso corporal del sujeto o de 0,1 -20 o 0,5-5 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/kg) o 10-1500 o 200-1500 mg como una dosificación fija. En algunos procedimientos, al paciente se le administra una dosis de al menos 1,5 mg/kg, al menos 2 mg/kg o al menos 3 mg/kg, administrada una vez cada tres
- 35 semanas o más. La dosificación depende de la frecuencia de administración, el estado del paciente y la respuesta al tratamiento anterior, si lo hay, si el tratamiento es profiláctico o terapéutico y si el trastorno es agudo o crónico, entre otros factores.
- La administración puede ser parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. La administración también se puede localizar directamente en un
- 40 tumor. Se prefiere la administración en la circulación sistémica por administración intravenosa o subcutánea. La administración intravenosa puede ser, por ejemplo, por infusión durante un período de 30 a 90 minutos o por inyección de un solo bolo.
- 45 La frecuencia de administración depende de la vida media del anticuerpo o del conjugado en la circulación, del estado del paciente y de la vía de administración, entre otros factores. La frecuencia puede ser diaria, semanal, mensual, trimestral o en intervalos irregulares en respuesta a los cambios en el estado del paciente o la progresión del cáncer que se está tratando. Una frecuencia ejemplar para la administración intravenosa es entre dos veces por semana y trimestralmente durante un tratamiento continuo, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.
- 50 Otras frecuencias ejemplares para la administración intravenosa son entre una vez por semana o tres de cada cuatro semanas durante un tratamiento continuo, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente. Para la administración subcutánea, una frecuencia de dosificación ejemplar es diaria a mensual, aunque también es posible una dosificación más o menos frecuente.
- 55 El número de dosificaciones administradas depende de la naturaleza del cáncer (por ejemplo, si presenta síntomas agudos o crónicos) y la respuesta del trastorno al tratamiento. Para los trastornos agudos o las exacerbaciones agudas de un trastorno crónico, entre 1 y 10 dosis a menudo son suficientes. A veces, una dosis de un solo bolo, opcionalmente en forma dividida, es suficiente para un trastorno agudo o la exacerbación aguda de un trastorno crónico. El tratamiento puede repetirse en caso de reaparición de un trastorno agudo o exacerbación aguda. Para los trastornos crónicos, un
- 60 anticuerpo puede administrarse a intervalos regulares, por ejemplo, semanalmente, quincenalmente, mensualmente,

trimestralmente, cada seis meses durante al menos 1, 5 o 10 años o la vida del paciente.

- Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferentemente estériles y sustancialmente isotónicas y se fabrican en condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse en forma de dosificación unitaria (es decir, la dosificación para una administración única). Las composiciones farmacéuticas pueden formularse utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la vía de administración seleccionada. Para la inyección, los anticuerpos pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, como la solución de Hank, la solución de Ringer o solución salina fisiológica o tampón de acetato (para reducir las molestias en el lugar de la inyección). La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. La concentración de anticuerpo en una formulación líquida puede ser, por ejemplo, 1-100 mg/ml, tal como 10 mg/ml.
- 15 El tratamiento con anticuerpos de la invención se puede combinar con quimioterapia, radiación, tratamiento con células madre, cirugía y otros tratamientos efectivos contra el trastorno que se está tratando. Las clases útiles de otros agentes que pueden administrarse con anticuerpos humanizados para LIV-1 incluyen, por ejemplo, anticuerpos para otros receptores expresados en células cancerosas, agentes antitubulina (por ejemplo, auristatinas), ligantes de surco menor de ADN, inhibidores de replicación de ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como
- 20 cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinos, compuestos de preformación, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizadores de radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca y similares.
- 25 El tratamiento con el anticuerpo anti-LIV-1 humanizado, opcionalmente en combinación con cualquiera de los otros agentes o regímenes descritos anteriormente solo o como un conjugado farmacológico de anticuerpos, puede aumentar la supervivencia media sin progresión o el tiempo de supervivencia general de los pacientes con tumores (por ejemplo, mama, próstata, melanoma), especialmente en recaída o refractarios, en al menos 30 % o 40 %, pero
- 30 preferentemente 50 %, 60 % a 70 % o incluso 100 % o más, en comparación con el mismo tratamiento (por ejemplo, quimioterapia), pero sin un anticuerpo anti-LIV-1 solo o como un conjugado. De manera adicional o alternativa, el tratamiento (por ejemplo, la quimioterapia estándar) que incluye el anticuerpo anti-LIV-1 solo o como un conjugado puede aumentar el índice de respuesta completa, el índice de respuesta parcial o el índice de respuesta objetiva (completa + parcial) de pacientes con tumores en al menos un 30 % o 40 %, pero preferentemente en un 50 %, 60 %
- 35 a 70 % o incluso 100 % en comparación con el mismo tratamiento (por ejemplo, quimioterapia), pero sin el anticuerpo anti-LIV-1.

Por lo general, en un ensayo clínico (por ejemplo, un ensayo de fase II, fase II/III o fase III), los aumentos antes mencionados en la supervivencia media sin progresión y/o el índice de respuesta de los pacientes tratados con terapia

40 estándar más el anticuerpo anti-LIV-1 humanizado, en relación con el grupo de control de pacientes que reciben solo la terapia estándar (o más placebo), son estadísticamente significativos, por ejemplo, en el nivel $p = 0,05$ o $0,01$ o incluso $0,001$. Los índices de respuesta completa y parcial se determinan según los criterios objetivos que se usan comúnmente en los ensayos clínicos para el cáncer, por ejemplo, según se indica o acepta por el Instituto Nacional del Cáncer y/o la Administración de Fármacos y Alimentos.

45

VIII. Otras aplicaciones

- Los anticuerpos humanizados anti-LIV-1 se pueden utilizar para detectar LIV-1 en el contexto del diagnóstico clínico o el tratamiento o en la investigación. La expresión de LIV-1 en un cáncer proporciona una indicación de que el cáncer
- 50 es susceptible de tratamiento con los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos también pueden venderse como reactivos de investigación para investigación de laboratorio en la detección de células que tienen LIV-1 y su respuesta a diversos estímulos. En dichos usos, los anticuerpos monoclonales pueden etiquetarse con moléculas fluorescentes, moléculas etiquetadas por centrifugado, enzimas o radioisótopos y pueden proporcionarse en forma de kit con todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo para LIV-1. Los anticuerpos descritos en el presente
- 55 documento, BR2-14a, BR2-22a y las versiones humanizadas de los mismos, por ejemplo, hLIV14 y hLIV22, pueden utilizarse para detectar la expresión de la proteína LIV-1 y determinar si un cáncer es susceptible de ser tratado con ADC de LIV-1. Como ejemplo, BR2-14a, BR2-22a y versiones humanizadas de los mismos, por ejemplo, hLIV14 y hLIV22 se pueden utilizar para detectar la expresión de LIV-1 en células de cáncer de mama, células de melanoma, células de cáncer cervical o células de cáncer de próstata. Los anticuerpos también se pueden utilizar para purificar
- 60 LIV-1, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

IX. LIV-1 de mono cynomolgus

En el presente documento se describe una secuencia de aminoácidos para LIV-1 (CY LIV-1) de monos cynomolgus en la SEQ ID NO: 85 con o sin un péptido de señal, que ocupa aproximadamente los residuos 1-28 de la SEQ ID NO: 85, así como ácidos nucleicos que codifican esas secuencias de aminoácidos. También se incluyen variantes que difieren en hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, eliminaciones o inserciones siempre que las variantes de CY no incluyan una secuencia de LIV-1 humana natural. De forma análoga a la LIV-1 humana, la referencia a CY-LIV-1 significa al menos un dominio extracelular de la proteína y normalmente la proteína completa que no sea un péptido de señal escindible (aminoácidos 1-28). La descripción proporciona además anticuerpos que se unen específicamente a la SEQ ID NO: 85 con o sin unión específica a LIV-1 humana (es decir, la unión a la LIV-1 humana al nivel del anticuerpo irrelevante de control negativo). La descripción proporciona además anticuerpos que se unen preferentemente a CY-LIV-1 sobre LIV-1 humana y viceversa. La unión preferente significa una asociación mayor más allá del error experimental y preferentemente al menos 2, 3 o 4 veces mayor. La descripción proporciona además anticuerpos que muestran el mismo perfil de unión para LIV-1 humana y CY dentro del error experimental como cualquiera de los anticuerpos ejemplificados descritos a continuación. La descripción proporciona además procedimientos para analizar la unión de un anticuerpo a LIV-1 CY. Dichos procedimientos implican poner en contacto un anticuerpo con LIV-1 CY, determinar si el anticuerpo se une específicamente a LIV-1 CY y, opcionalmente, determinar una medida de la fuerza de unión, como una constante de asociación.

EJEMPLOS

I. Humanización de BR2-14a

25 Materiales

Las líneas celulares descritas en los siguientes ejemplos se mantuvieron en cultivo de acuerdo con las condiciones especificadas por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) o la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania (DMSZ). Los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA.) u otros proveedores.

Metodologías:

35 Ensayos de unión de saturación

1×10^5 células que expresan antígeno (ya sea células MCF7 (ATCC) que expresan LIV-1 humana, una línea celular CHO transfectada que expresa LIV-1 humana o una línea celular CHO transfectada que expresa LIV-1 cyno) se dividieron en partes alícuotas por pocillo de placas de fondo en v de 96 pocillos. Se añadió mAb de LIV-1 murina etiquetada con AlexaFluor-647, por ejemplo, BR2-14a, en concentraciones que oscilaron entre 0,66 pM y 690 nM y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se sedimentaron y se lavaron 3X veces con PBS/BSA. Luego las células se sedimentaron y precipitaron en 125 μ L de PBS/BSA. La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo, utilizando el porcentaje de señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje de enlace y para calcular posteriormente la K_d aparente.

45 Ensayos de unión de competencia

1×10^5 células CHO que expresan LIV-1 humana recombinante en PBS/BSA se dividieron en partes alícuotas en cada pocillo de placas de fondo en v de 96 pocillos en hielo. Las células se incubaron durante 1 hora con mAb de LIV-1 murina parental etiquetada con 5 nM de AlexaFluor-647 (AF) y concentraciones crecientes (de 0,038 nM a 600 nM) de mAb de LIV-1 humanizada no etiquetada, combinaciones de cadenas ligeras humanizadas LA-LF y cadenas pesadas humanizadas HA-HE. Las células se sedimentaron y se lavaron 3 veces con PBS/BSA. Las células se sedimentaron y se precipitaron en 125 μ L de PBS/BSA. La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo, utilizando el porcentaje de señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje de enlaces mAb de LIV-1 murina etiquetada y, posteriormente, extrapolar el EC50 ajustando los datos a una curva de dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable.

1×10^5 células MCF7 que expresan LIV-1 en PBS/BSA se dividieron en partes alícuotas en cada pocillo de placas de un fondo en v de 96 pocillos en hielo. Las células se incubaron durante 1 hora con mAb de LIV-1 murina etiquetada con 5 nM de AlexaFluor-647 y concentraciones crecientes (de 0,038 nM a 600 nM) de mAb de LIV-1 humanizada no

etiquetada, combinaciones de cadenas ligeras humanizadas LA-LF y cadenas pesadas humanizadas HA-HE. Las células se sedimentaron y se lavaron 3 veces con PBS. Las células se sedimentaron y se precipitaron en 125 µL de PBS/BSA. La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo, utilizando el porcentaje de señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje de enlaces mAb de LIV-1 murina etiquetada y, posteriormente, extrapolar el EC50 ajustando los datos a una curva de dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable.

1x10⁵ células CHO que expresan LIV-1 cyno recombinante en PBS se dividieron en partes alícuotas en cada pocillo de placas de fondo en v de 96 pocillos en hielo. Las células se incubaron durante 1 hora con mAb de LIV-1 murina etiquetada con 5 nM de AlexaFluor-647 y concentraciones crecientes (de 0,038 nM a 600 nM) de mAb de LIV-1 humanizada no etiquetada, combinaciones de cadenas ligeras humanizadas LA-LF y cadenas pesadas humanizadas HA-HE. Las células se sedimentaron y se lavaron 3 veces con PBS. Las células se sedimentaron y se precipitaron en 125 µL de PBS/BSA. La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo, utilizando el porcentaje de señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje de enlaces mAb de LIV-1 murina etiquetada y, posteriormente, extrapolar el EC50 ajustando los datos a una curva de dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable.

Análisis citométrico de flujo cuantitativo

La cuantificación del número de copias de LIV-1 en las superficies celulares se determinó utilizando mAb de LIV-1 murina como anticuerpo primario y el ensayo de citometría de flujo DAKO QiFiKit indirecto según lo descrito por el fabricante (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca) y se evaluó con un citómetro de flujo Becton Dickinson FACS@can.

Ensayo de citotoxicidad

Las células tumorales se incubaron con conjugados farmacológicos de anticuerpo LIV-1 durante 96-144 horas a 37 °C. Se utilizó un ADC no vinculante (H00) como control negativo. La viabilidad celular se midió con resazurina (Sigma) a la concentración final de 50 µM. Las células se incubaron durante cuatro a seis horas a 37°. La señal fluorescente se midió en un lector de placa fluorescente de fusión HT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los resultados se informan como IC₅₀, la concentración de compuesto necesaria para producir una reducción del 50 % en la viabilidad en comparación con las células tratadas mediante vehículo (control = 100 %).

Producción de conjugados farmacológicos de anticuerpos

Los conjugados farmacológicos de anticuerpo de los anticuerpos de LIV-1 se prepararon como se describe en el documento US20050238649. Los enlazadores de fármacos vcMMAE (también conocidos como 1006) y mcMMAF (conocidos como 1269) se describen en el documento US20050238649. La preparación de mutantes de cisteína de anticuerpos IgG1 se describe generalmente en el documento US20100158919, US20050238649y US20100158919.

Producción de mAb de anti-LIV-1 no fucosilada

Una línea celular CHO DG44 que produce el anticuerpo monoclonal anti-LIV-1 humanizado IgG1, mAb HBLB (hLIV-14), se cultivó a 3,0 x 10⁵ células por ml en 30 ml de medio de cultivo de CHO a 37°, CO₂ al 5 % y se agitó a 100 RPM en un matraz de agitación de 125 ml. Los medios se suplementaron con factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), penicilina, estreptomycin y 65 µM de peracetato de 2-fluorofucosa (SGD-2084) (véase el documento US20090317869). Los cultivos se alimentaron el día 3 con un volumen del 2 % de medios de alimentación. El día cuatro, el cultivo se dividió 1:4 en medios de cultivo frescos. Los cultivos se alimentaron con un volumen del 6 % de medios de alimentación de producción en los días 5, 7, 9 y 10. Los medios condicionados se recolectaron el día 13 pasando el cultivo a través de un filtro de 0,2 µm. La purificación del anticuerpo se realizó aplicando el medio acondicionado a una columna de proteína A pre-equilibrada con solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS), pH 7,4.

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

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

La actividad de ADCC se midió utilizando el ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr. En resumen, las células tumorales diana MCF-7 se etiquetaron con 100 µCi de Na⁵¹CrO₄, se lavaron y se incubaron previamente con anticuerpos de prueba antes de la adición de células efectoras (asesina natural, NK por sus siglas en inglés). Se prepararon células NK (CD16⁺ CD56⁺) a partir de células mononucleares sanguíneas periféricas no adherentes (PBMC) obtenidas de

donantes normales de FcγRIIIA 158V/V (Lifeblood, Memphis, TN) con esferas inmunomagnéticas (EasySep, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Se agregaron células NK viables a las células diana en un efector a una proporción de células diana de 10:1. Se utilizó una IgG1k humana (Ancell, Bayport, MN) como control negativo en este ensayo. Después de 4 horas de incubación, los sobrenadantes se recogieron y se secaron durante una noche en placas de Luma. La radiación gamma emitida por las células MCF-7 lisadas se detectó utilizando el contador de centelleo y luminiscencia de microplacas TopCount (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). La actividad de ADCC se reporta como % de lisis específica.

Estudio de actividad *in vivo*

Los ratones desnudos (*nu/nu*) (7-8 animales/grupo) se implantaron con células tumorales cultivadas en cultivo: MCF-7 de NCI (5 x 10⁶ células en 25 % de matrigel), PC3 de ATCC (2,5 x 10⁶ células en 25 % de matrigel) y PC3 de DSMZ (5 x 10⁵ en 25 % de matrigel). Para el crecimiento *in vivo* de células MCF-7, los ratones hembras también recibieron suplementos de estrógeno mediante la implantación de un sedimento de estrógeno de liberación lenta (liberación a 90 días). La dosificación con ADC de LIV-1 humanizada o quimérica o ADC de control no vinculante (3 mg/kg) comenzó cuando los tumores alcanzaron los 100 mm³ (q4d x 4 inyecciones intraperitoneales). Los volúmenes tumorales se monitorizaron utilizando calibradores y los animales se sacrificaron cuando el volumen tumoral alcanzó ~800 mm³. Los diagramas de volumen medio tumoral continuaron para cada grupo hasta que uno o más animales se sacrificaron. Todos los procedimientos con animales se realizaron bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en un establecimiento acreditado por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio.

Tinción inmunohistoquímica (IHC) de LIV-1

Procedimiento

Las micromatrices tumorales (TMA) y las muestras tumorales individuales se obtuvieron de fuentes comerciales. Las micromatrices de tejidos normales o tumorales fijados con formalina e impregnados en parafina (FFPE) se compraron en US Biomax Inc. o Cybrdi. Se compró una matriz congelada de BioChain. Las secciones individuales se adquirieron de NDRI, Asterand, Tissue Solution o CHTN. El Dr. R. Vessella, del departamento de cáncer genitourinario de la Universidad de Washington proporcionó un conjunto de 25 muestras impregnadas en parafina de cáncer de próstata refractario con hormonas metastásicas (sitios metastásicos de tejidos blandos y huesos correspondientes). Todas las muestras se procesaron en una estación de tinción automatizada Bond-Max™ (Leica).

Tinción de IHC de tejidos FFPE:

Los portaobjetos de FFPE o las TMA seccionados en portaobjetos de vidrio se desparafinizaron utilizando una solución Bond™ Dewax (Leica, cat # AR9222) a 72 °C y se rehidrataron. La recuperación de antígenos se realizó utilizando la solución 2 de recuperación de epítomos Bond™ basada en EDTA (Leica, cat # AR9640) durante 20 minutos a 95-100 °C antes de la incubación con el mAb de LIV-1 murina primaria (1-2 µg/ml durante 30-45 minutos a 25 °C). Se utilizó IgG1 murina de isotipo coincidente (Sigma; cat # M5284) como control negativo para la tinción de fondo. Para la tinción de IHC automatizada se utilizó un kit DAB de pulido o un kit de detección basado en fosfatasa alcalina: Kit de detección rojo AP de polímero Bond™ (Leica, cat # DS9305). Los portaobjetos se incubaron con anticuerpos primarios monoclonales murinos contra mAb de LIV-1 murina durante 45 minutos a 1 µg/ml con un bloque de proteínas preliminar de 30 minutos (DAKO cat # X0909). Después del desarrollo del cromógeno, las secciones se contratintaron con hematoxilina y se cubrieron con un cubreobjetos. Los portaobjetos fueron evaluados y calificados por un patólogo y se tomaron imágenes utilizando un microscopio Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

IHC de tejidos congelados:

Secciones de 5 µm de muestras congeladas/OCT se fijaron con acetona durante 10 minutos, se secaron al aire durante 30 minutos y se pretrataron 20 minutos con 1xMorfosave a temperatura ambiente. Los portaobjetos se cargaron en la estación de tinción automatizada Bond-Max™ (Leica) y se tintaron durante 45 minutos con un anticuerpo primario con un bloque de proteínas preliminar de 30 minutos (DAKO cat # X0909). Se utilizó IgG1 de ratón (BD Pharmingen cat # 550878) como control negativo. Para la detección, se utilizó el kit de pulido de polímero Bond basado en DAB (Leica, cat # DS9800). Después del desarrollo del cromógeno, las secciones se contratintaron con hematoxilina y se cubrieron con un cubreobjetos. Los portaobjetos fueron evaluados y calificados por el patólogo.

Resultados

1. Unión del anticuerpo de ratón

La K_D para el anticuerpo monoclonal BR2-14a de LIV-1 murina (US2004141983) se determinó para LIV-1 humana expresada como una proteína endógena en una línea celular de cáncer de mama humana o como una proteína recombinante en una línea celular CHO. La K_D para el anticuerpo BR2-14a de LIV-1 murina también se determinó para la LIV-1 cyno expresada como una proteína recombinante en una línea celular CHO. MCF7 es una línea celular de cáncer de mama humano. 293F es una línea celular de riñón embrionario humano. La Tabla 1 muestra que el anticuerpo tenía una constante de disociación aproximadamente 5 veces menor para la LIV-1 no recombinante expresada desde una línea celular humana que la LIV-1 recombinante, ya sea humana (hLIV-1) o de monos cynomolgus (cyLIV-1).

Tabla 1

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

2. Diseño y ensayos de anticuerpos humanizados

El punto de partida o anticuerpo donante para la humanización en este ejemplo es el anticuerpo de ratón BR2-14a producido por el hibridoma que tiene el número de accesión de ATCC PTA-5705A y se describe en el documento US2004141983. Las secuenciasceptoras humanas adecuadas son secuencias genómicas proporcionadas por VH1-02 y JH5 para la cadena pesada y por VK2-30 y Jk4 para la cadena ligera. Las secuenciasceptoras humanas muestran una identidad de 68 y 85 por ciento con las secuencias del donante en las estructuras de región variable. Las CDR de cadena ligera de las secuenciasceptoras humanas son del mismo tipo canónico que las CDR de las secuencias donantes. En cambio, las CDR de cadena pesada de las secuenciasceptoras humanas diferían en su tipo canónico (la línea germinal era 1-3 frente a 1-2 para el donante murino).

El alineamiento de las secuencias del donante identificó once posiciones en la cadena pesada (H27, H28, H29, H30, H48, H66, H67, H71, H76, H93 y H94) y cinco posiciones en la cadena ligera (L36, L37, L45, L46 y L39) en la que la secuencia aceptora humana se diferenció de la secuencia del donante y esto puede afectar la unión del anticuerpo como resultado del contacto directo con el antígeno, afectando la conformación de las CDR o afectando el relleno entre las cadenas pesadas y ligeras. Se hicieron cinco cadenas pesadas humanizadas y seis cadenas ligeras humanizadas incorporando mutaciones posteriores en diferentes permutaciones de estas posiciones (Figura 1 (alineamiento de secuencias) y Tabla 2).

Tabla 2: Retromutaciones

Variante V_H	Secuencia aceptora de exón VH	Residuos estructurales de donante
hV _H A	VH1-02	ninguno
hV _H B	VH1-02	H29, H30, H76
hV _H C	VH1-02	H66, H67, H71
hV _H D	VH1-02	H27, H93, H94
hV _H E	VH1-02	H27, H28, H29, H30, H48, H76, H66, H67, H71, H93, H94

Variante V_L	Secuencia aceptora de exón VL	Residuos estructurales de donante
hV _K A	VK2-30	ninguno
hV _K B	VK2-30	L36
hV _K C	VK2-30	L37
hV _K D	VK2-30	L45
hV _K E	VK2-30	L46
hV _K F	VK2-30	L36, L37, L39, L45, L46

Luego se expresaron anticuerpos humanizados que representan cada permutación de estas cadenas (30 posibilidades) de las cadenas pesada y ligera humanizadas. Las curvas de unión para LIV-1 humana recombinante expresada a partir de células CHO se muestran en la figura 2. Los EC₅₀' se resumen en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: EC₅₀ para anticuerpos mAb de LIV-1 humanizados, derivados de BR2-14a, en LIV-1 humana expresada en células CHO

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

Estos datos indican una variación considerable de EC₅₀ entre los 30 anticuerpos humanizados probados con HBLB y HELE que muestran al menos dos veces mejor unión que el siguiente anticuerpo humanizado HBLF y márgenes mayores sobre la mayoría de los anticuerpos humanizados. Las curvas de unión de la figura 2 muestran que tanto HBLB como HELE tenían una unión más fuerte que el anticuerpo de ratón original.

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

Los EC₅₀ para el mAb de LIV-1 humanizada que se unió a la LIV-1 humana expresada en células CHO se determinaron para LIV-1 humana expresada como una proteína nativa en una línea celular MCF7 (figura 3). De nuevo, se determinó que mAb de LIV-1 HBLB y HELE eran los aglutinantes más endurecidos.

El K_d para HBLB a LIV-1 humana en la línea celular MCF7 se determinó a partir del promedio de varias curvas de unión de saturación como 1,5 nM, mientras que para el anticuerpo de ratón es de 2,9 nM. En otras palabras, el anticuerpo HBLB tiene aproximadamente el doble de afinidad con la LIV-1 humana nativa que el anticuerpo de ratón. La curva de unión de saturación que se muestra en la figura 4 es un ejemplo representativo.

Se compararon dos formas de HBLB para la unión con LIV-1 humana expresada de forma recombinante a partir de células CHO. Una forma se expresó con IgG1 humana de tipo salvaje y regiones constantes kappa. La otra forma fue la misma, excepto por una mutación S239C (numeración de la UE) en la cadena pesada de IgG1 (denominada LIV-14d o HBLB S239C), que reduce la unión del anticuerpo a los receptores gamma Fc. Las curvas de unión y los EC₅₀ de estos anticuerpos en comparación con el anticuerpo donante de ratón se muestran en la figura 5. Las EC₅₀ de

ambas formas de HBLB fueron similares entre sí (dentro del error del estudio), y ambas fueron más fuertes que el anticuerpo de ratón.

- 5 Las EC50 para el mAb de LIV-1 humanizada HBLB y HBLB S239C también se determinaron para la LIV-1 cyno expresada como una proteína recombinante en una línea celular CHO. Ambos anticuerpos se unen con igual afinidad (mejor que el mAb de LIV-1 murina).

Datos de expresión para LIV-1

- 10 Se utilizaron mAb de LIV-1 murina (al menos 2 para concordancia) para el análisis inmunohistoquímico de diversos tipos de tumores utilizando tejidos impregnados en parafina fijados con formalina.

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

Origen	Tipo	LIV-1+	Nº de casos	%
Mama	Primario y metastásico (TMA)			28-46
	Tumores primarios	12	12	100
	Tumores metastásicos	17	19	89
	Tratamiento pos-hormonal	19	22	86
	Triple negativo	13	20	65
Próstata	Refractario hormonal metastásico: mets óseos	15	25	60
	mets de tejido blando	21	25	84
Ovario	Primario (TMA)	9	72	13
	Metastásico (TMA)	4	11	36
	Tratamiento pos-quimioterapéutico	5	17	29
Endometrio		7	56	12
Carcinoma de células escamosas (órganos uterinos y múltiples)	Tumores primarios	8	114	7
Pancreático	Tumores primarios	9	95	9
Pulmón	Tumores primarios (TMA)	3	192	2

- 15 Se observó una menor positividad de LIV-1 IHC en estudios realizados con micromatrices de tejido en comparación con secciones amplias de tejido. La diferencia en la expresión es altamente significativa, sugiriendo que se prefiere el análisis de la expresión de LIV-1 en secciones de tejido más amplias. Hubo una buena concordancia de expresión utilizando al menos 2 mAb de anti-LIV-1 diferentes. Las figuras 6 y 7 muestran un alto nivel de expresión de LIV-1 en los tumores de mama y próstata con tratamiento pos-hormonal (inhibidores de tamoxifeno o aromatasa) que proporcionan una sólida justificación para atacar estos tumores utilizando un ADC de LIV-1. La figura 8 muestra la expresión detectable de LIV-1 en tejidos de cáncer de mama triple negativo (ER-, PgR-, Her2-). El nivel de expresión de LIV-1 en el cáncer de mama triple negativo por tinción inmunohistoquímica fue comparable al nivel en el modelo animal PC3, donde se demostró la actividad antitumoral de ADC de LIV-1. Los cánceres de mama triple negativos son, por lo tanto, una posible población diana, en particular los cánceres de mama triple negativos que se han descubierto que expresan LIV-1.

Actividad antitumoral *in vitro* de mAb de hLIV-14 como ADC y mAb mejorado de función efectora (SEA)

- La actividad antitumoral de los ADC de LIV-1 *in vitro* se midió utilizando tanto los ensayos de citotoxicidad (figura 9) como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (figuras 10 y 11). Primero, se realizó un estudio de la expresión de LIV-1 en varias líneas celulares mediante análisis cuantitativo FACS. La línea celular de cáncer de mama MCF-7 de ATCC tuvo el nivel más alto de sitios/células de unión a LIV-1, en comparación con la línea celular MCF-7 de otras fuentes (datos no mostrados). Se utilizó esta línea celular para ambos ensayos *in vitro*. Con referencia a la figura 9, varios ADC de hLIV-14 (el anticuerpo HBLB conjugado con vcMMAE (denominado 1006) o mcMMAF (denominado 1269) (las moléculas pequeñas y/o los enlazadores descritos en el documento US20050238649)) fueron altamente eficaces para matar las células MCF-7, en comparación con los conjugados de control murino y no vinculante (mIgG-1006, mIgG-1269, hIgG-1006 y hIgG-1269). Además, los ADC de LIV-14d mutantes de cisteína, que tienen un promedio de dos enlazadores farmacológicos por anticuerpo también fueron altamente eficaces para matar células MCF-7, según lo medido por el ensayo citotóxico. Con referencia a las figuras 10 y 11, en los ensayos de

ADCC, se comparó la actividad del mAb y los ADC fucosilados/de tipo salvaje (WT) con las versiones mejoradas de función efectora (mAb y ADC no fucosilados, denominados SEA). Los resultados demostraron que los mAb de LIV-1 mejorados de la función efectora y los ADC tienen una buena actividad de ADCC en relación con las células MCF-7, en comparación con los mAb o ADC mejorados con la función no efectora (compárese, por ejemplo, hLIV-1 SEA vcMMAE de la figura 10 con hLIV-1 vcMMAE). Con referencia nuevamente a la figura 9, una función efectora mejorada de ADC de LIV-1 (indicada como SEA) también tuvo un nivel similar de actividad citotóxica como los ADC de tipo salvaje (no fucosilados) (compárese hLIV-1 SEA 1006 (vcMMAE) con hLIV-1 1006(vcMMAE)). Por lo tanto, la citotoxicidad puede verse afectada por la función efectora y la acción conjugada.

10 Actividad antitumoral *in vivo* de ADC de hLIV-14

Utilizando modelos de cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de próstata (PC-3), se determinó la actividad antitumoral de los ADC de LIV-1 (mAb quiméricos y humanizados (HBLB) con un promedio de 4 fármacos por anticuerpo) *in vivo* (Figs. 12-15). Los ADC de LIV-1 conjugados con vcMMAE mostraron un retraso significativo del tumor en comparación con los ADC no tratados y de control. Se observó al menos una regresión completa (CR) en todos los estudios que utilizaron LIV-1-vcMMAE a 3 mg/kg con una cantidad de animales que tenían tumores que eran estáticos o crecían lentamente en comparación con los controles. Con referencia a la figura 12, una forma quimérica del anticuerpo murino parental conjugado con vcMMAE dio como resultado regresiones completas en 3 de 7 ratones. Con referencia a la figura 13, el mismo ADC quimérico produjo una regresión completa en 1 de 8 ratones. Con referencia a la figura 14, un ADC humanizado (HBLB) conjugado con vcMMAE (hLIV-14-vcMMAE(4)) produjo una regresión completa en 1 de 8 ratones. Además, una forma mutante de cisteína del anticuerpo HBLB, un enlazador farmacológico vcMMAE conjugado con cada cadena pesada en la posición 239, produce un conjugado con una carga farmacológica promedio de 2 enlazadores de fármaco por anticuerpo; hLIV-14d-vcMMAE(2)) designada presentó una actividad similar a la forma 4 cargada. Con referencia a la figura 15, el ADC humanizado (HBLB) conjugado con vcMMAE (hLIV-14-vcMMAE(4)) produjo una regresión completa en 1 de 8 ratones en un modelo de carcinoma de próstata. En cambio, la actividad de los dos mutantes de cisteína cargados no fue tan pronunciada en este modelo (compárese hLIV-14-vcMMAE(4) con hLIV-14d-vcMMAE(2), y hLIV-14-mcMMAF(4) con hLIV-14d-mcMMAF(2)). En resumen, estos estudios demuestran que el ADC de LIV-1 puede detener o retrasar el crecimiento de los cánceres que expresan LIV-1, incluidos el de mama y el de próstata.

II. Humanización de BR2-22a

BR2-22a, a veces también denominado mAb2, es un anticuerpo monoclonal de ratón del isotipo IgG1 Kappa.

35 Metodologías:

A menos que se indique lo contrario a continuación, los procedimientos descritos para la humanización y ensayo de BR2-14a también son aplicables a BR2-22.

40 Ensayos de unión de saturación

1×10^5 células que expresan antígeno (ya sea células MCF7 que expresan LIV-1 humana, células 239F, una línea celular CHO transfectada que expresa LIV-1 humana o una línea celular CHO transfectada que expresa LIV-1 cyno) se dividieron en partes alícuotas por pocillo de placas de fondo en v de 96 pocillos. Se añadió BR2-22a murino etiquetado con AlexaFluor-647 en concentraciones que oscilaron entre 0,66 pM y 690 nM y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se sedimentaron y se lavaron 3X veces con PBS/BSA. Luego las células se sedimentaron y precipitaron en 125 μ L de PBS/BSA. La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo, utilizando el porcentaje de señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje de enlace y para calcular posteriormente la K_d aparente.

Ensayos de unión de competencia

1×10^5 células CHO que expresan LIV-1 recombinante en PBS se dividieron en partes alícuotas en cada pocillo de placas de fondo en v de 96 pocillos en hielo. Las células se incubaron durante 1 hora con BR2-22a parental etiquetado con 5 nM de AlexaFluor-647 (AF) y concentraciones crecientes (de 0,038 nM a 600 nM) de anticuerpo BR2-22a humanizado no etiquetado, en todas las combinaciones de cadenas ligeras humanizadas LA-LG y cadenas pesadas humanizadas HA-HG. Las células se sedimentaron y se lavaron 3 veces con PBS. Luego las células se sedimentaron y precipitaron en 125 μ L de PBS/BSA. La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo, utilizando el porcentaje de señal fluorescente saturada para determinar el porcentaje de enlace de anticuerpo BR2-22a humanizado etiquetado y posteriormente, extrapolar el EC50 ajustando los datos a una curva de dosis-respuesta sigmoidal con pendiente

variable.

Estudio de actividad *in vivo*

- 5 Los ratones desnudos (*nu/nu*) (7-8 animales/grupo) se implantaron con células tumorales cultivadas en cultivo: MCF-7 NCI a 5×10^6 en 25 % de matrigel, PC3 de ATCC ($2,5 \times 10^6$ células en 25 % de matrigel) y PC3 de DSMZ (5×10^5 en 25 % de matrigel). Para el crecimiento *in vivo* de células MCF-7, los ratones hembras también recibieron suplementos de estrógeno mediante la implantación de un sedimento de estrógeno de liberación lenta (liberación a 90 días). La dosificación con ADC de LIV-1 humanizada o quimérica o ADC de control no vinculante (3 mg/kg) comenzó
- 10 cuando los tumores alcanzaron los 100 mm^3 (q4d x 4 inyecciones intraperitoneales). Los volúmenes tumorales se monitorizaron utilizando calibradores y los animales se sacrificaron cuando el volumen tumoral alcanzó $\sim 800 \text{ mm}^3$. Los diagramas de volumen medio tumoral continuaron para cada grupo hasta que uno o más animales se sacrificaron. Todos los procedimientos con animales se realizaron bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en un establecimiento acreditado por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del
- 15 Cuidado de Animales de Laboratorio.

Resumen de los resultados y descripción

Unión de saturación

- 20 BR2-22a muestra 94 % de identidad con BR2-14a en la región variable de cadena pesada madura y 91 % de identidad en la región variable de cadena ligera madura. La KD para la Liv1 murina de BR2-22a (Tabla 5) se determinó para LIV-1 humana expresada como una proteína endógena en una línea celular de cáncer de mama humano, en células 293F o como una proteína recombinante en una línea celular CHO. La KD para BR2-22a también se determinó para la LIV-1 cyno expresada como una proteína recombinante en una línea celular CHO.

25

Tabla 5: Mediciones de afinidad de BR2-22a para (hLIV-1) humana y LIV-1 cyno (cyLIV-1).

Línea celular	Antígeno	Kd (nM)
MCF7 (ATCC)	hLIV-1	1,1
293F (hLIV-1)	hLIV-1	0,5
Cho hLIV-1	hLIV-1	1,5
Cho cyLIV-1	cLIV-1	4,2

Estrategia de humanización

- 30 El anticuerpo BR2-22a se humanizó utilizando una secuencia aceptora de línea germinal VH1-02 JH5 para la cadena pesada y una secuencia aceptora VK2-30 JK4 para la cadena ligera. Estas secuenciasceptoras se seleccionaron basándose en que tienen la identidad de secuencia más alta para las estructuras de región variable maduras de las cadenas pesada y ligera de BR2-22A. Inicialmente se construyeron cinco variantes de cadenas pesadas. Cada una incluía las tres CDR Kabat de la cadena pesada de BR2-22a, donde las cadenas diferían en tener de cero (VA) a 11
- 35 (VE) retromutaciones. Inicialmente se construyeron seis variantes de cadenas ligeras. Cada una incluía las tres CDR de Kabat de la cadena ligera de BR2-22a y de cero (LA) a cuatro retromutaciones (LF). Estas retromutaciones se seleccionaron como resultado del modelado del anticuerpo BR2-22A para identificar posiciones con potencial para interactuar con el antígeno directamente, afectar la conformación de CDR o afectar la interfaz entre las cadenas pesada y ligera y se basaron en la experiencia previa en BR2-14a humanizante debido a la alta identidad de secuencia
- 40 entre BR2-14a y BR2-22a. De hecho, las mismas once posiciones en la cadena pesada y las mismas cuatro posiciones en la cadena ligera se consideraron para la retromutación tanto en BR2-14a como en BR2-22a (L39 no se consideró en BR2-22a porque el residuo del ratón es el mismo que el residuo humano). Las retromutaciones presentes en cada variante del BR2-22a humanizado se muestran en las Tablas 6 y 7 a continuación.

45

Tabla 6

Variante V_H	Secuencia aceptora de exón VH	residuos estructurales de donante
hV _H A	VH1-02	Ninguno
hV _H B	VH1-02	H29, H30, H76
hV _H C	VH1-02	H66, H67, H71
hV _H D	VH1-02	H27, H93, H94
hV _H E	VH1-02	H27, H28, H29, H30, H48, H66, H67, H71, H76, H93, H94
hV _H F	VH1-02	H27, H29, H30, H94

hV _H G	VH1-02	H27, H29, H30, H76, H94
-------------------	--------	-------------------------

Tabla 7

Variante V _L	Secuencia aceptora de exón VL	residuos estructurales de donante
hV _K A	VK2-30	Ninguno
hV _K B	VK2-30	L36
hV _K C	VK2-30	L37
hV _K D	VK2-30	L45
hV _K E	VK2-30	L46
hV _K F	VK2-30	L36, L37, L45, L46
hV _K G	VK2-30	L36, L46

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

5

Todas las permutaciones de estas cinco cadenas pesadas y seis cadenas ligeras se probaron posteriormente en un ensayo de competencia comparado con BR2-22a (véase la figura 17). Sorprendentemente, en vista de la experiencia con el anticuerpo BR2-14a en el que se obtuvo una unión mejorada con respecto al anticuerpo de ratón con solo cuatro retromutaciones y otras retromutaciones no se mejoró necesariamente la afinidad de unión, la única combinación de cadenas humanizadas que mostró una afinidad de unión aproximada a la de BR2-22a fue HELF con 15 retromutaciones. Las otras permutaciones mostraron una unión pobre o no significativa con LIV-1. Los EC₅₀ de las diferentes permutaciones se indican en la Tabla 8, a continuación.

10

Tabla 8: EC₅₀ para anticuerpos BR2-22a humanizados

Ab	EC ₅₀ (µg/ml)
HALA	DNB
HALB	DNB
HALC	DNB
HALD	DNB
HALE	DNB
HALF	33,2
HBLA	DNB
HBLB	4,9
HBLC	DNB
HBLD	DNB
HBLE	DNB
HBLF	6,5
HCLA	DNB
HCLB	>100
HCLC	DNB
HCLD	DNB
HCLE	DNB
HCLF	>100
HDLA	DNB
HDLB	DNB
HDLC	DNB
HDLD	DNB
HDLE	DNB
HDLF	14,4
HELA	68,2
HELB	>100
HELC	65,7
HELD	>100
HELE	25,1
HELF	0,3
HELG	0,2
HFLF	0,8
HFLG	0,8
HGLF	0,4

HGLG	0,5
DNB significa que no se unió	

Aunque HELF muestra una unión satisfactoria, el anticuerpo contiene un total de 15 retromutaciones, un número superior al ideal con respecto a la inmunogenicidad potencial. Por lo tanto, las cadenas HE y LF se modificaron sistemáticamente para probar el efecto de eliminar las retromutaciones individuales. La figura 18 muestra las variantes probadas. LF-1 a LF-4 difieren de LF en que cada una carece de una retromutación diferente presente en LF. De manera similar, HE-1 a HE-11 carecen de una de las retromutaciones presentes en HE. La figura 19 compara LF-1 a LF-4 (cada una emparejada con HE). La figura 19 muestra que LF-2 y LF-3 pierden una afinidad de unión sustancial en relación con LF (indicado como control histórico de HELF en el gráfico), mientras que esto no sucede con LF-1 y LF-4. Se concluye que las mutaciones secundarias L36 y L46 contribuyen sustancialmente a la retención de la afinidad de unión, mientras que las retromutaciones en las posiciones L37 y L45 pueden dispensarse sin un efecto significativo en la unión. La figura 20 muestra curvas de unión similares para las variantes de HE. La figura 20 muestra que HE-11 perdió la mayor parte de su unión, lo que indica que la retromutación en la posición H94 tiene el mayor efecto sobre la afinidad de unión de las retromutaciones probadas. La pérdida de retromutaciones en las posiciones H27, H29 y H30 también causó una pérdida significativa de afinidad. El papel de H30 se puede racionalizar porque el residuo de ratón es el resultado de una mutación somática. La pérdida de una retromutación en la posición H76 causó cierta pérdida de afinidad. Las otras retromutaciones en las posiciones H28, H48, H66, H67, H71 y H93 podrían dispensarse con poco o ningún efecto sobre la afinidad de unión.

A la luz de estos experimentos, se construyeron las cadenas pesadas HF y HG al igual que la cadena ligera LG. HF incluyó retromutaciones en H27, H29, H30 y H94 y HG incluyó estas mutaciones y una retromutación en H76. LG contiene retromutaciones en L36 y L46. Varias permutaciones de HF, HG, LE y LF se probaron para determinar la unión competitiva como se muestra en la figura 21 y todas mostraron unión dentro de un factor de tres de las BR2-22a de ratón.

A la luz de este experimento, se seleccionó HGLG para experimentos adicionales que representaban la mejor combinación de afinidad de unión y el menor número de retromutaciones. Este anticuerpo en lo sucesivo se denomina hLIV22. La afinidad de unión a la saturación de hLIV22 para LIV-1 humana y cyno expresada a partir de células CHO se muestra en la figura 22 en comparación con la de hLIV14. La figura 22 muestra que hLIV22 tiene una afinidad aproximadamente cuatro veces mayor (inversa de la constante de disociación) para LIV-1 humana que para hLIV14. Además, la afinidad de hLIV22 por LIV-1 humana es la misma dentro del error experimental que su afinidad por la LIV-1 de cynomolgus, mientras que hLIV14 muestra el doble de afinidad por la LIV-1 humana que por la LIV-1 de cynomolgus. La afinidad de hLIV22 para LIV-1 humana es la misma dentro del error experimental que la del anticuerpo de ratón original, BR2-22a.

35 Actividad antitumoral *in vitro* ADC de hLIV22

La actividad antitumoral de ADC de hLIV22 *in vitro* se midió utilizando ensayos de citotoxicidad. Primero, se realizó un estudio de la expresión de LIV-1 en varias líneas celulares mediante análisis cuantitativo FACS. La línea celular de cáncer de mama MCF-7 de ATCC tuvo el nivel más alto de sitios/células de unión a LIV-1, en comparación con la línea celular MCF-7 de otras fuentes (datos no mostrados). Se utilizó esta línea celular para ensayos *in vitro*. Se observó que varios ADC de hLIV22 (conjugados con vcMMAE (denominado como 1006) o mcMMAF (denominado como 1269) (ambas moléculas pequeñas descritas en el documento US 2005-0238649)) fueron altamente eficaces para matar células MCF-7 según lo medido por el ensayo citotóxico *in vitro*. Las figuras 23 y 24 comparan hLIV22 conjugado con 1006 o 1269 con un anticuerpo de control no vinculante conjugado con 1006 o 1269.

45 Actividad antitumoral *in vivo* de ADC de LIV-1

Mediante modelos de cáncer de próstata (PC-3) y de cáncer de mama (MCF-7) como se muestra en las figuras 25 y 26, se determinó la actividad antitumoral de los ADC de hLIV22 (con un promedio de 4 fármacos por anticuerpo) *in vivo*. Los ADC de hLIV22 conjugados con vcMMAE mostraron un retraso significativo del tumor en comparación con los ADC no tratados y de control. Se observaron múltiples regresiones completas en el estudio de MCF-7 utilizando hLIV22-vcMMAE a 3 mg/kg. Además, en todos los estudios hubo varios animales que tenían tumores que eran estáticos o que crecían lentamente en comparación con los controles. Estos estudios demuestran que el ADC de hLIV22 puede detener o retrasar el crecimiento de los cánceres que expresan LIV-1, incluidos el de mama y el de próstata. La figura 27 compara la actividad de los ADC de hLIV22 y hLIV14 en el modelo de MCF-7. Aunque ambos anticuerpos fueron eficaces, hLIV22 fue ligeramente más eficaz.

Los ADC de hLIV22 también se probaron en un modelo de cáncer cervical. Se utilizó un modelo de xenoinjerto de células HeLa para el ensayo. Después de que los tumores crecieron a un tamaño adecuado, se administró hLIV22

conjugado con vcMMAE a animales a 3 mg/kg y 1 mg/kg. Se administró un conjugado de anticuerpo de control a 3 mg/kg. Se observó una regresión completa y parcial en los animales que recibieron 3 mg/kg de conjugado de hLIV22 vcMMAE. (Datos no mostrados). Por lo tanto, los anticuerpos LIV-1 y los conjugados farmacológicos de anticuerpos pueden utilizarse para tratar los cánceres cervicales que expresan LIV-1.

5

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

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

- 10 Las muestras de melanoma de los pacientes se evaluaron para determinar la expresión de LIV-1, utilizando la tinción de IHC. Los portaobjetos de FFPE se desparafinizaron utilizando una solución Dewax de Bond™ (Leica, cat # AR9222) a 72 °C. La recuperación de antígenos se realizó utilizando la solución 2 de recuperación de epítomos Bond™ basada en EDTA (Leica, cat # AR9640) durante 20 minutos a 100 °C. Para la tinción de IHC se utilizó un kit de detección basado en fosfatasa alcalina: Kit de detección rojo de pulido de polímero Bond™ (Leica, cat # DS9390). Los
- 15 portaobjetos se incubaron con anticuerpos primarios monoclonales murinos contra LIV-1 (BR2-14a) durante 45 minutos a 1 µg/ml con un bloque de proteínas preliminar de 30 minutos (DAKO cat # X0909). Se utilizó IgG de ratón (Sigma, cat # M5284) como control negativo. Después del desarrollo del cromógeno, las secciones se contratintaron con hematoxilina y se cubrieron con un cubreobjetos. Los portaobjetos fueron evaluados y calificados por el patólogo.
- 20 Los resultados se muestran en la figura 28. El setenta y dos por ciento de las muestras de pacientes con melanoma analizadas (21/29) fueron positivas para la expresión de LIV-1. Esto indica que los inhibidores de LIV-1, por ejemplo, los anticuerpos anti-LIV-1, se pueden utilizar para tratar los cánceres de melanoma.

Actividad anti-melanoma *in vivo* de ADC de LIV-1

- 25 Se implantan ratones desnudos (nu/nu) (7-8 animales/grupo) con 10×10^6 células SK-MEL-5 (una línea celular derivada de tumor de melanoma) cultivadas en cultivo. Se permite que los tumores crezcan *in vivo* hasta que alcancen los 100 mm³, según lo medido con un calibrador. Los ADC de LIV-1 humanizadas, por ejemplo, hLIV14 o hLIV22, se administran a 3 mg/kg. Los conjugados farmacológicos son, por ejemplo, vcMMAE o mcMMAF. Los ADC de control
- 30 también se administran a animales de control a 3 mg/kg. Los ADC se administran como q4d x 4 inyecciones intraperitoneales. Los volúmenes tumorales se monitorizan utilizando calibradores y los animales se sacrifican cuando el volumen tumoral alcanza ~800 mm³. La administración de ADC de hLIV14 o ADC de hLIV22 reduce considerablemente el crecimiento de tumores en animales en comparación con aquellos animales que recibieron ADC de control.

35

Listado de secuencias

- SEQ ID NO:1 <líder de cadena ligera de mAb de LIV-1;PRT/1;mus músculo>
40 MKLPVRLVLVLMFWIPVSTS
SEQ ID NO:2 <líder de cadena pesada de mAb de LIV-1;PRT/1;mus músculo>
MKCSWVIFFLMAVVLGINS
SEQ ID NO:3 <secuencia líder de cadena pesada de reemplazo;PRT/1;mus músculo>
MAWVWTLFLMAAAQSAQA
- 45 SEQ ID NO:4 <región constante de cadena ligera;PRT/1;homo sapiens>
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC
SEQ ID NO:5 <CH1-CH3;PRT/1;homo sapiens>
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:6 <cadena ligera CH1 - CH3 (no c-term K);PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:7<S239C cadena pesada CH1 - CH3;PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:8<S239C cadena pesada CH1 - CH3 (no c-term K);PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

5 EALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:9<hLIV-1 mAb HA;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWID
PENGDEYAPTFFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHDAHYG
TWFAYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:10<hLIV-1 mAb HB;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTIEDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWID
PENGDEYAPTFFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHDAHYG
TWFAYWGQGTLLTVSS

10 SEQ ID NO:11<hLIV-1 mAb HC;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWID
PENGDEYAPTFFQGKATMTADTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHDAHYG
TWFAYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:12<hLIV-1 mAb HD;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWID
PENGDEYAPTFFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCNVHDAHYG
TWFAYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO:13<hLIV-1 mAb HE;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIEDYYMHWVRQAPGQGLEWIGWID
PENGDEYAPTFFQGKATMTADTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCNVHDAHYG
TWFAYWGQGTLLTVSS

15 SEQ ID NO:14<hLIV-1 mAb LA;PRT/1;artificial>

DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWFQQRPQGQSPRRL
IYRVSNRFSGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

SEQ ID NO:15<hLIV-1 mAb LB;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWYQQRPGQSPRRL
IYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

SEQ ID NO:16<hLIV-1 mAb LC;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWFLQRPQSPRRL
IYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

SEQ ID NO:17<hLIV-1 mAb LD;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWFQQRPGQSPKRL
IYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

5

SEQ ID NO:18<hLIV-1 mAb LE;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWFQQRPGQSPRLL
IYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

SEQ ID NO:19<hLIV-1 mAb LF;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWYLQKPGQSPKLL
IYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

10

Secuencias de ADN:

SEQ ID NO:20<líder de cadena pesada de mAb de LIV-1;ADN;mus músculo>

atgaaatgcagctgggtcatcttcttctctgatggcagtggttctaggaatca
attca

15 SEQ ID NO:21<líder de cadena ligera de mAb de LIV-1;ADN;mus músculo>

atgaagttgcctgttaggctgttggtgctgatgttctggattcctgtttcta
ccagt

SEQ ID NO:22<secuencia líder de cadena pesada de reemplazo;ADN;mus músculo>

atggcttgggtgtggaccttgctattcctgatggcagctgcccaggagcc
aagca

SEQ ID NO:23<región constante de cadena ligera;ADN;mus músculo>

acgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttga
aatctggaactgcctctgttggtgtgctgaataacttctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccag
gagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagca
ccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcga
agtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagggga
gagtgt

20

SEQ ID NO:24<CH1-CH3;ADN;homo sapiens>

gctagcaccaaggggccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagca
cctctgggggacagctgccttgggctgcttggtaaggactacttccctga
acctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacc
ttccccggtgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtga
ccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatca
caagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattcttgtgac
aaaactcacacatgccccaccgtgccccagcacctgaactcctggggggaccgt
cagtcttccctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgctgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
cgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacct
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaac
aaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgacca
gaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatc
gccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagagaacaactacaagaccacgc
ctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagctcacct
ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcac
gaggtctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctccgggt
aa

SEQ ID NO:25<CH1-CH3 (w/o c-term K) ; ADN; homo sapiens>

gctagcaccaaggggccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagca
cctctgggggacagctgccttgggctgcttggtaaggactacttccctga
acctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacc
ttccccggtgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtga
ccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatca
caagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattcttgtgac
aaaactcacacatgccccaccgtgccccagcacctgaactcctggggggaccgt
cagtcttccctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgctgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
cgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacct
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaac
aaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgacca
gaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatc
gccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagagaacaactacaagaccacgc
ctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagctcacct
ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcac
gaggtctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctccgggt

5

SEQ ID NO:26<S239C CH1-CH3;ADN;artificial>

gctagcaccaaggggcccattctgtcttccccctggcaccctcctccaagagca
cctctgggggacagctgccctgggctgcttggtaaggactacttccctga
acctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacc
ttccccggtgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtga
ccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatca
caagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattcttgtgac
aaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgt
gtgtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgctgtggtggtagctgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
cgcgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacct
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaac
aaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgacca
gaaccaggtcagcctgacctgcttggtaaaaggcttctatcccagcgacatc

gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgc
ctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacct
ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
gaggtctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctccgggta
aa

SEQ ID NO:27<S239C CH1-CH3 (w/o c-term K) ; ADN; artificial>

gctagcaccaaggggcccattctgtcttccccctggcaccctcctccaagagca
cctctgggggacagctgccctgggctgcttggtaaggactacttccctga
acctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacc
ttccccggtgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtga
ccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatca
caagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattcttgtgac
aaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgt
gtgtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgctgtggtggtagctgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
cgcgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacct
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaac
aaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgacca
gaaccaggtcagcctgacctgcttggtaaaaggcttctatcccagcgacatc
gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgc
ctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacct
ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
gaggtctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctccgggt

5

SEQ ID NO:28<hLIV-1 mAb HA;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatgca
ctgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggatgggatggattgat
cctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttccagggcagggtcacca
tgaccagggacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacatgatgctcactatggg
acctggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

SEQ ID NO:29<hLIV-1 mAb HB;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggatacacattgaagactactatatgca
ctgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggatgggatggattgat
cctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttccagggcagggtcacca
tgaccagggacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcaggtgag

atctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacatgatgctcactatggg
acctggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

5

SEQ ID NO:30<hLIV-1 mAb HC;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatgca
ctgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggatgggatggattgat
cctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttccagggcaaggccacta
tgactgcagacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacatgatgctcactatggg
acctggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

SEQ ID NO:31<hLIV-1 mAb HD;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggattcaccttcacagactactatatgca
ctgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggatgggatggattgat
cctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttccagggcagggtcacca
tgaccagggacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacatgatgctcactatggg
acctggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

10

SEQ ID NO:32<hLIV-1 mAb HE;ADN;artificial>

Caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggattcaacattgaagactactatatgca
ctgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggattggatggattgat
cctgagaatggtgatactgaatatgccccaccttccagggcaaggccacta
tgactgcagacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtaatgtccatgatgctcactatggg
acctggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

SEQ ID NO:33<hLIV-1 mAb LA;ADN;artificial>

gatgttgtgatgactcagtctccactctccctgctgtcaccccttggacagc
ctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatggaaa
cacctatattggaatggtttcagcagaggccaggccaatctccaaggaggcta
atztatagagtttccaacagggttttctgggggtcccagacagattctctggca
gtgggtcaggcactgattttcacactgaaaatcagcagggtggaggctgagga
tggtgggggtttattactgctttcaagggttcacatgttccctacacctttgga
ggagggaccaaggtggagatcaaacgt

SEQ ID NO:34<hLIV-1 mAb LB;ADN;artificial>

gatgttgtgatgactcagtctccactctccctgctgtcaccccttggacagc
ctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatggaaa
cacctatattggaatggtaccagcagaggccaggccaatctccaaggaggcta

atztatagagtttccaacagggttttctgggggtcccagacagattctctggca
gtgggtcaggcactgattttcacactgaaaatcagcagggtggaggctgagga
tggtgggggtttattactgctttcaagggttcacatgttccctacacctttgga

5 ggagggaccaaggtggagatcaaacgt

SEQ ID NO:35<hLIV-1 mAb LC;ADN;artificial>

gatgttgtgatgactcagtctccactctccctgctgtcaccccttggacagc
ctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatggaaa
cacctatattggaatggtttctgcagaggccaggccaatctccaaggaggcta
atztatagagtttccaacagggttttctgggggtcccagacagattctctggca
gtgggtcaggcactgattttcacactgaaaatcagcagggtggaggctgagga
tggtgggggtttattactgctttcaagggttcacatgttccctacacctttgga
ggagggaccaaggtggagatcaaacgt

SEQ ID NO:36<hLIV-1 mAb LD;ADN;artificial>

gatgttgtgatgactcagtctccactctccctgctgtcaccccttggacagc
ctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatggaaa
cacctatattggaatggtttcagcagaggccaggccaatctccaaaggaggcta
atztatagagtttccaacagggttttctgggggtcccagacagattctctggca
gtgggtcaggcactgattttcacactgaaaatcagcagggtggaggctgagga
tggtgggggtttattactgctttcaagggttcacatgttccctacacctttgga
ggagggaccaaggtggagatcaaacgt

10 SEQ ID NO:37<hLIV-1 mAb LE;ADN;artificial>

gatgttgtgatgactcagtctccactctccctgctgtcaccccttggacagc
ctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatggaaa
cacctatattggaatggtttcagcagaggccaggccaatctccaaggctccta
atztatagagtttccaacagggttttctgggggtcccagacagattctctggca
gtgggtcaggcactgattttcacactgaaaatcagcagggtggaggctgagga
tggtgggggtttattactgctttcaagggttcacatgttccctacacctttgga
ggagggaccaaggtggagatcaaacgt

SEQ ID NO:38<hLIV-1 mAb LF;ADN;artificial>

gatgttgtgatgactcagttctccactctccctgctgtcacccttggacagc
ctgcctccatctcctgcagatctagtcagagcattataaggaatgatggaaa
cacctatttgggaatggtacctgcagaaaccaggccaatctccaaagctccta
atttatagagtttccaacagggttttctgggggtcccagacagattctctggca
gtgggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcaggggtggagggtgagga
tggtgggggtttattactgctttcaagggttcacatgttccctacacctttgga
ggagggaaccaagggtggagatcaaact

SEQ ID NO:39<líder de cadena ligera de mAb2 de Liv1;PRT/1;mus músculo>

MKLPVRLLLVMFWIPVATSS

SEQ ID NO:40<líder de cadena pesada de mAb2 de Liv1;PRT/1;mus músculo>

5 MKCSWVIFFLMAVVIGINS

SEQ ID NO:41<secuencia líder de cadena pesada de reemplazo;PRT/1;mus músculo>

MAWVWTLFLMAAAQSAQA

SEQ ID NO:42<región constante de cadena ligera; PRT/1; homo sapiens>

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

10 SEQ ID NO:43<CH1-CH3;PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO:44<cadena ligera CH1 - CH3 (no c-term K);PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:45<S239C cadena pesada CH1 - CH3;PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN

15

KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:46<S239C cadena pesada CH1 - CH3 (no c-term K);PRT/1;homo sapiens>

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:47<hLiv1 mAb2 HA;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGWID
PENGDT EYGPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHNAHYG
TWFAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:48<hLiv1 mAb2 HB;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTIEDYYMHWRQAPGQGLEWMGWID
PENGDT EYGPKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHNAHYG
TWFAYWGQGTLVTVSS

5

SEQ ID NO:49<hLiv1 mAb2 HC;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGWID
PENGDT EYGPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHNAHYG
TWFAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:50<hLiv1 mAb2 HD;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGWID
PENGDT EYGPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCTVHNAHYG
TWFAYWGQGTLVTVSS

10

SEQ ID NO:51<hLiv1 mAb2 HE;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLNIEDYYMHWRQAPGQGLEWIGWID
PENGDT EYGPKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCTVHNAHYG
TWFAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:52<hLiv1 mAb2 HF;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLTIEDYYMHWRQAPGQGLEWMGWID
PENGDT EYGPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAVHNAHYG
TWFAYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:53<hLiv1 mAb2 HG;PRT/1;artificial>

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGLTIEDYYMHWRQAPGQGLEWMGWID
PENGDT EYGPKFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCAVHNAHYG
TWFAYWGQGTLVTVSS

15

SEQ ID NO:54<hLiv1 mAb2 LA;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWFQQRPGQSPRRL
IYKISTRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFG
GGTKVEIKR

SEQ ID NO:55<hLiv1 mAb2 LB;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWYQQRPGQSPRRL
IYKISTRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFG
GGTKVEIKR

20

SEQ ID NO:56<hLiv1 mAb2 LC;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWFLQRPQSPRRL
IYKISTRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFG
GGTKVEIKR

SEQ ID NO:57<hLiv1 mAb2 LD;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWFQQRPGQSPKRL
IYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

SEQ ID NO:58<hLiv1 mAb2 LE;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWFQQRPGQSPRPL
IYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

SEQ ID NO:59<hLiv1 mAb2 LF;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWYLQRPQSPKPL
IYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

5

SEQ ID NO:60<hLiv1 mAb2 LG;PRT/1;artificial>

DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLHSSGNTYLEWYQQRPGQSPRPL
IYKISTRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFG
GGTKVEIKR

Secuencias de ADN:

10

SEQ ID NO:61<líder de cadena pesada de mAb2 de Liv1;ADN;mus músculo>

atgaaatgcagctgggtcatcttcttctctgatggcagtggttataggaatca
attca

SEQ ID NO:62<líder de cadena ligera de mAb2 de Liv1;ADN;mus músculo>

atgaagttgcctgttaggctgttggtgctgatgttctggattcctgctacca
gcagt

15 SEQ ID NO:63<secuencia líder de cadena pesada de reemplazo;ADN;mus músculo>

atggccttgggtgtggaccttgctattcctgatggcagctgcccaaagtgcc
aagca

SEQ ID NO:64<región constante de cadena ligera;ADN;homo sapiens>

acgacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagt
tgaaatctggaactgcctctgttggtgctgaataacttctatcccag
agaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagca
gcacctgacgctgagcaaacgagactacgagaaacacaaagtctacgctg
cgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacagg
ggagagtgttag

SEQ ID NO:65<CH1-CH3;ADN;homo sapiens>

gctagcaccaaggggccatctgttcttccccctggcaccctcctccaagagca
cctctgggggacacagctgccttgggctgcctggtaaggactacttccctga
acctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacc
ttccccggtgtcctacagtcctcaggactctaactccctcagcagcgtggtga
ccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatca
caagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattcttgtgac
aaaactcacacatgccccaccgtgccccagcacctgaactcctggggggaccgt
cagtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgctgtggtggtagctgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
cgcgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacct
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaac
aaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgacca
gaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatc
gccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagacaactacaagaccacgc
ctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacct
ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
gaggtctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctccgggt
aa

SEQ ID NO:66<CH1-CH3 (w/o c-term K);ADN;homo sapiens>

gctagcaccaaggggccatctgttcttccccctggcaccctcctccaagagca
cctctgggggacacagctgccttgggctgcctggtaaggactacttccctga
acctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacc
ttccccggtgtcctacagtcctcaggactctaactccctcagcagcgtggtga
ccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatca
caagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaattcttgtgac
aaaactcacacatgccccaccgtgccccagcacctgaactcctggggggaccgt
cagtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgctgtggtggtagctgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
cgcgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacct
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaac
aaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgacca
gaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatc
gccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagacaactacaagaccacgc
ctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacct
ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgc
gaggtctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctccgggt

5

SEQ ID NO:67<S239C CH1-CH3;ADN;artificial>

gctagcaccaaggggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagca
cctctgggggacacagctgccctgggctgcttgggtcaaggactacttccctga
acctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacc
ttccccggtgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtga
ccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatca
caagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatacttgtgac
aaaactcacacatgccccaccgtgccccagcacctgaactcctggggggaccgt
gtgtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
cgcgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacct
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaac
aaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgacaa
gaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatc

gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgc
ctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacct
ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctctcatgctccgtgatgc
gaggtctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctccgggta
aa

SEQ ID NO:68<S239C CH1-CH3 (w/o c-term K) ; ADN; artificial>

gctagcaccaaggggcccatctgtcttccccctggcaccctcctccaagagca
cctctgggggacacagctgccctgggctgcttgggtcaaggactacttccctga
acctgtgacagtgtcctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacc
ttccccggtgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtga
ccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatca
caagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatacttgtgac
aaaactcacacatgccccaccgtgccccagcacctgaactcctggggggaccgt
gtgtcttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggac
ccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc
cgcgaggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacct
cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaac
aaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgacaa
gaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatc
gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgc
ctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacct
ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctctcatgctccgtgatgc
gaggtctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtctccgggt

5 SEQ ID NO:69<hLiv1 mAb2 HA;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatgca
ctgggtgaggcagggccctggacaagggtctgagtggatgggatggattgat
cctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaaagttccagggcagggtcacca
tgaccagggacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacataatgctcactacggg
acctgggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

SEQ ID NO:70<hLiv1 mAb2 HB;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatgca
ctgggtgaggcagggccctggacaagggtctgagtggatgggatggattgat
cctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaaagttccagggcagggtcacca
tgaccagggacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcaggtgag

atctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacataatgctcactacggg
acctgggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

5

SEQ ID NO:71<hLiv1 mAb2 HC;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacagactactatatgca
ctgggtgaggcagggccctggacaagggtctgagtggatgggatggattgat
cctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaaagttccagggcaaggccacca
tgaccgcagacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtgccagacataatgctcactacggg
acctgggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

SEQ ID NO:72<hLiv1 mAb2 HD;ADN;artificial>

Caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggactcaccttcacagactactatatgca
ctgggtgaggcagggccctggacaagggtctgagtggatgggatggattgat
cctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaaagttccagggcagggtcacca
tgaccagggacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtactgtccataatgctcactacggg
acctgggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

10

SEQ ID NO:73<hLiv1 mAb2 HE;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggactcaacattgaagactactatatgca
ctgggtgaggcagggccctggacaagggtctgagtggattggatggattgat
cctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaaagttccagggcaaggccacca
tgaccgcagacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtactgtccataatgctcactacggg
acctgggtttgcttactggggccaaggaaccctgggtcacagtctcctca

SEQ ID NO:74<hLiv1 mAb2 HF;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggactcaccattgaagactactatatgca
ctgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggatgggatggattgat
cctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaagttccagggcagggtcacca
tgaccagggacacctccatcagcacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtgccgtccataatgctcactacggg
acctgggtttgcttactggggccaaggaaccctggtcacagtctcctca

SEQ ID NO:75<hLiv1 mAb2 HG;ADN;artificial>

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag
tgaaggtctcctgcaaggcttctggactcaccattgaagactactatatgca
ctgggtgagggcagggccctggacaagggcttgagtggatgggatggattgat

cctgaaaatggtgatactgaatatggcccgaagttccagggcagggtcacca
tgaccagggacacctccatcaacacagcctacatggagctgagcaggtgag
atctgatgacacagctgtgtattactgtgccgtccataatgctcactacggg
acctgggtttgcttactggggccaaggaaccctggtcacagtctcctca

5

SEQ ID NO:76<hLiv1 mAb2 LA;ADN;artificial>

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatgttgtgatgactcagtctcca
ctctccctgcctgtcacccttggacagcctgcctccatctcctgcagatcta
gtcagagccttttacacagtagtggaacacacctatttagaatggtttcagca
gagggccaggccaatctccaaggaggctaattttataaaaatttccacccgattt
tctgggggtcccagacagattctctggcagtgggtcaggcactgatttcacac
tgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatgttgggggtttattactgctttca
aggttcacatgttccctacacctttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa
cgtaacg

SEQ ID NO:77<hLiv1 mAb2 LB;ADN;artificial>

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatgttgtgatgactcagtctcca
ctctccctgcctgtcacccttggacagcctgcctccatctcctgcagatcta
gtcagagccttttacacagtagtggaacacacctatttagaatggtaggca
gagggccaggccaatctccaaggaggctaattttataaaaatttccacccgattt
tctgggggtcccagacagattctctggcagtgggtcaggcactgatttcacac
tgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatgttgggggtttattactgctttca
aggttcacatgttccctacacctttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa
cgtaacg

10 **SEQ ID NO:78<hLiv1 mAb2 LC;ADN;artificial>**

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatgttgtgatgactcagtctcca
ctctccctgcctgtcacccttggacagcctgcctccatctcctgcagatcta
gtcagagccttttacacagtagtggaacacacctatttagaatggtttctgca
gagggccaggccaatctccaaggaggctaattttataaaaatttccacccgattt
tctgggggtcccagacagattctctggcagtgggtcaggcactgatttcacac
tgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatgttgggggtttattactgctttca
aggttcacatgttccctacacctttggaggagggaaccaaggtggagatcaaa
cgtaacg

SEQ ID NO:79<hLiv1 mAb2 LD;ADN;artificial>

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatgttgtgatgactcagtcctcca
ctctccctgcctgtcacccttggacagcctgcctccatctcctgcagatcta
gtcagagccttttacacagtagtggaacacctaatttagaatggtttcagca
gagggccaggccaatctccaaagaggctaatttataaaaatttccacccgattt
tctgggggtcccagacagattctctggcagtgggtcaggcactgatttcacac
tgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatgttgggggtttattactgctttca

aggttcacatgttcctacacctttggaggagggaccaaggtggagatcaaa
cgtaacg

SEQ ID NO:80<hLiv1 mAb2 LE;ADN;artificial>

gatgttctggattcctgctaccagcagtgatgttgtgatgactcagtcctcca
ctctccctgcctgtcacccttggacagcctgcctccatctcctgcagatcta
gtcagagccttttacacagtagtggaacacctaatttagaatggtttcagca
gagggccaggccaatctccaaaggccctaatttataaaaatttccacccgattt
tctgggggtcccagacagattctctggcagtgggtcaggcactgatttcacac
tgaaaatcagcaggggtggaggctgaggatgttgggggtttattactgctttca
aggttcacatgttcctacacctttggaggagggaccaaggtggagatcaaa
cgtaacg

5

SEQ ID NO:81<hLiv1 mAb2 LF;ADN;artificial>

gatgttgtgatgactcagtcctccactctccctgcctgtcacccttggacagc
ctgcctccatctcctgcagatctagtcagagccttttacacagtagtgga
cacctaatttagaatggtacctgcagaggccaggccaatctccaaagccccta
atttataaaaatttccacccgattttctgggggtcccagacagattctctggca
gtgggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcaggggtggaggctgagga
tggtgggggtttattactgctttcaaggttcacatgttccctacacctttgga
ggaggggaccaaggtggagatcaaacgt

SEQ ID NO:82<hLiv1 BR2-22a LG;ADN;artificial>

gatgttgtgatgactcagtcctccactctccctgcctgtcacccttggacagc
ctgcctccatctcctgcagatctagtcagagccttttacacagtagtgga
cacctaatttagaatggtaccagcagaggccaggccaatctccaaagccccta
atttataaaaatttccacccgattttctgggggtcccagacagattctctggca
gtgggtcaggcactgatttcacactgaaaatcagcaggggtggaggctgagga
tggtgggggtttattactgctttcaaggttcacatgttccctacacctttgga
ggaggggaccaaggtggagatcaaacgt

10 **SEQ ID NO:83<Q13433; proteína**

MARKLSVILI LTFALSVTNP LHELKAAFP QTTEKISP
ESGINVDLAI STRQYHLQQL FYRYGENNSL SVEGFRKLLQ
NIGIDKIKRI HIHHDHDS DHEHSDHER HSDHEHHSEH
EHSDHDS HNHAAAGKN KRKALCPDHD SDSSGKDPRN
SQGKAHRPE HASGRNVKD SVSASEVTST VYNTVSEGT
FLETIETPRP GKLFPKDVSS STPPSVTSKS RVSRLAGRKT

NESVSEPRKG FMYSRNTNEN PQECFNASKL LTSHGMGIQV
 PLNATEFNYL CPAIINQIDA RSCLIHITSEK KAEIPPKTYS
 LQIAWVGGF I AISIISFLSL LGVILVPLMN RVFFKFLLSF
 LVALAVGTLS GDAFLHLLPH SHASHHHSHS HEEPAMEMKR
 GPLFSHLSSQ NIEESAYFDS TWKGLTALGG LYFMFLVEHV
 LTLIKQFKDK KKKNQKKPEN DDDVEIKKQL SKYESQLSTN
 EEKVDTDRT EGYLRADSQE PSHFDSQQPA VLEEEVVMIA
 HAHPQEVYNE YVPRGCKNKC HSHFHDITLGQ SDDLIIHHHHD
 YHHILHHHHH QNHHPHSHSQ RYSREELKDA GVATLAWMVI
 MGDGLHNFSD GLAIGAAFE GLSSGLSTSV AVFCHELPHE
 LGDFAVLLKA GMTVKQAVLY NALSAMLAYL GMATGIFIGH
 YAENVSMWIF ALTAGLFMYV ALVDMVPEML HNDASDHGCS
 RWGYFFLQNA GMLLGFGIML LISIFEHKIV FRINF
 SEQ ID NO:84<AAA96258.2; proteína
 MARKLSVILI LTFALSVTNP LHELKAAAF QTTEKISPW
 ESGINVDLAI STRQYHLQQL FYRYGENNSL SVEGFRKLLQ
 NIGIDKIKRI HHHHDHDSHS DHEHSDHER HSDHEHSDH
 EHSDDHNAHAA SGKNKRKALC PDHSDSSGK DPRNSQGKGA
 HRPEHASGRR NVKDSVSASE VTSTVYNTVS EGTHFLETIE
 TPRPGKLFPK DVSSSTPPSV TSKSRVSRLA GRKTNESVSE
 PRKGFMYSRN TNENPQECFN ASKLLTSHGM GIQVPLNATE
 FNYLCPAIIN QIDARSCLIH TSEKKAEIPP KTYSLQIAWV
 GGFIAISIIS FLSLLGVILV PLMNRVFFKF LLSFLVALAV
 GTLSGDAFLH LLPHSHASHH HSHSHEEPAM EMKRGPLFSH
 LSSQNIEESA YFDSTWKGLT ALGGLYFMFL VEHVLTLIKQ
 FKDKKKKNQK KPENDDVEI KKQLSKYESQ LSTNEEKVDT
 DRTTEGYLRA DSQEP SHFDS QQPAVLEEEE VMIAHAHPQE
 VYNEYVPRGC KNKCHSHFHD TLGQSDDLII HHHDYHHILH
 HHHHQNHHPH SHSQRYSSREE LKDAGVATLA WMVIMGDGLH
 NFSDGLAIGA AFTEGLSSGL STSVAVFCHE LPHELGDFAV
 LLKAGMTVKQ AVLYNALSAM LAYLGMATGI FIGHYAENV
 MWIFALTAGL FMYVALVDMV PEMLHNDASD HGCSRWGYFF

5 LQNAGMLLGF GIMLLISIFE HKIVFRINF
 SEQ ID NO:85>LIV-1 cyno

MARKLSVILILTFTLSVTNPLHELKSAAAFQTTTEKISPNWESGINVDLAIT
 TRQYHLQQLFYRYGENNSLSVEGFRKLLQNIQIDKIKRIHIHHDHSDHE
 HSDHEHSDHEHSHRNHAASGKNKRKALCPEHSDSSGKDPNRSQKGGAH
 RPEHANGRRNVKDSVSTSEVTSTVYNTVSEGTHFLETIETPKLFPKDVSSST
 PPSVTEKSLVSRLAGRKTNESMSEPRKGFMYSRNTNENPQECFNASKLLTSH
 GMGIQVPLNATEFNYLCPAIINQIDARSCLHTSEKKAEIPPKTYSLQIAWV
 GGFIAISIIISFLSLLGVILVPLMNRVFFKFLLSFLVALAVGTLSGDAFLHLL
 PHSHASHHHSHSHEEPAMEMKRGPLFSLSSQNIIESAYFDSTWKGLTALGG
 LYFMFLVEHVLTLLIKQFKDKKKKNQKKPENDDDVEIKKQLSKYESQLSTNEE
 KVDTDDETEGYLRADSQEPHFDSQQPAILEEEVMIHAHPQEVYNEYVPR
 GCKNKCHSHFHDTLGQSDDLHHHHHDYHHILHHHHHQNHHPHSHSQRYSREE
 LKDAGIATLAWVMVIMGDGLHNFSDGLAIGAAFTGLSSGLSTSVAVFCHELP
 HELGDFAVLLKAGMTVKQAVLYNALSLAYLGMATGIFIGHYAENVSMWIF
 ALTAGLFMYVALVDMVPEMLHNDASDHGCSRWGYFFLQAGMLLGFGIMLLI
 SIFEHKIVFRINF

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Seattle Genetics, Inc.
 <120> Anticuerpos humanizados para LIV-1 y uso de los mismos para tratar el cáncer
 <130> N400275EP-A
 <150> US 61/420,291
 <151> 06/12/2010
- 10 <150> US 61/446,990
 <151> 25/02/2011
 <160> 85
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
- 15 <211> 19
 <212> PRT
 <213> mus músculo
 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Leu | Pro | Val | Arg | Leu | Leu | Val | Leu | Met | Phe | Trp | Ile | Pro | Val |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- Ser Thr Ser
- 20 <210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> mus músculo
 <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Cys | Ser | Trp | Val | Ile | Phe | Phe | Leu | Met | Ala | Val | Val | Leu | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- Ile Asn Ser
- 25 <210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> mus músculo
- 30 <400> 3
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Trp | Val | Trp | Thr | Leu | Leu | Phe | Leu | Met | Ala | Ala | Ala | Gln | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- Ala Gln Ala

ES 2 719 548 T3

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5 <400> 4

```

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
 <211> 330
 <212> PRT
 10 <213> homo sapiens
 <400> 5

```

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
  
```

ES 2 719 548 T3

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

<210> 6

<211> 329

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 6

ES 2 719 548 T3

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

ES 2 719 548 T3

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 7

<211> 330

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 7

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

ES 2 719 548 T3

```

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro
    115                                120                        125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                                135                        140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
    145                                150                        155                        160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    165                                170                        175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    180                                185                        190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
    195                                200                        205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                                215                        220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
    225                                230                        235                        240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
    245                                250                        255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
    260                                265                        270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
    275                                280                        285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                                295                        300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
    305                                310                        315                        320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    325                                330

```

<210> 8

<211> 329

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 8

ES 2 719 548 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Cys	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	225	230	235	240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	

ES 2 719 548 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada humanizada

<400> 9

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Asp Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cadena pesada humanizada

<400> 10

ES 2 719 548 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Asp Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada humanizada

<400> 11

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

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

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

ES 2 719 548 T3

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

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Asp Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada humanizada

<400> 12

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Asn Val His Asp Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cadena pesada humanizada

<400> 13

ES 2 719 548 T3

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Asn Val His Asp Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera humanizada

<400> 14

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Ile Arg Asn
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

ES 2 719 548 T3

```

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5 <220>
  <223> cadena ligera humanizada
  <400> 15
      Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
      1          5          10
      Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Ile Arg Asn
      20          25          30
      Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
      35          40          45
      Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50          55          60
      Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65          70          75          80
      Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85          90          95
      Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100          105          110
      Arg
10 <210> 16
    <211> 113
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial
    <220>
    <223> cadena ligera humanizada
15 <400> 16

```

ES 2 719 548 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Ile Arg Asn
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera humanizada

<400> 17

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Ile Arg Asn
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

ES 2 719 548 T3

<210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cadena ligera humanizada
 <400> 18

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

<210> 19
 10 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cadena ligera humanizada
 15 <400> 19

ES 2 719 548 T3

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

Arg

<210> 20
 <211> 57
 <212> ADN
 5 <213> mus músculo
 <400> 20
 atgaaatgca gctgggtcat ctcttctctg atggcagtggt ttctaggaat caattca 57
 <210> 21
 <211> 57
 10 <212> ADN
 <213> mus músculo
 <400> 21
 atgaagtggc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgtttc taccagt 57
 <210> 22
 15 <211> 57
 <212> ADN
 <213> mus músculo
 <400> 22
 atggcttggg tgtggacctt gctattctctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagca 57
 20 <210> 23
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> mus músculo
 <400> 23
 acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacagagaaa 240
 cacaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaagagac 300
 25 ttcaacaggg gagagtgt 318

<210> 24
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

5 <400> 24
 gctagcacca agggcccac tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcattgatct ccggacccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccacac ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacaca 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 25
 10 <211> 987
 <212> ADN
 <213> homo sapiens
 <400> 25

ES 2 719 548 T3

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacacettcc cggctgtcct acagtcctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac	540
agcagctacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtccctgacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag	720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg	900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacaca	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggt	987

<210> 26

<211> 990

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 26

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacacettcc cggctgtcct acagtcctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300

ES 2 719 548 T3

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtgtgtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 27

<211> 987

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 27

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc 120
 tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccttcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtgtgtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 987

10

<210> 28

<211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> secuencia sintética
 <400> 28
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaca gactactata tgcactgggt gaggcaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg agaatgggtga tactgaatat 180
 gccccacct tccagggcag ggtcaccatg accagggaca cctccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc cagacatgat 300
 gctcactatg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca 360
 <210> 29
 <211> 360
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia sintética
 <400> 29
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccattgaa gactactata tgcactgggt gaggcaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg agaatgggtga tactgaatat 180
 gccccacct tccagggcag ggtcaccatg accagggaca cctccatcaa cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc cagacatgat 300
 gctcactatg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca 360
 15 <210> 30
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> secuencia sintética
 <400> 30
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcaca gactactata tgcactgggt gaggcaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg agaatgggtga tactgaatat 180
 gccccacct tccagggcaa ggccactatg actgcagaca cctccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc cagacatgat 300
 gctcactatg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca 360
 25 <210> 31
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> secuencia sintética
 <400> 31

	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggatt caccttcaca gactactata tgcactgggt gaggcaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg agaatgggtga tactgaatat	180
	gccccacct tccagggcag ggtcaccatg accagggaca cctccatcag cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc cagacatgat	300
	gctcactatg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca	360
<210>	32	
<211>	360	
<212>	ADN	
5 <213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	secuencia sintética	
<400>	32	
	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggatt caacattgaa gactactata tgcactgggt gaggcaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gattggatgg attgatcctg agaatgggtga tactgaatat	180
	gccccacct tccagggcaa ggccactatg actgcagaca cctccatcaa cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtaa tgtccatgat	300
	gctcactatg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca	360
10 <210>	33	
<211>	339	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
15 <223>	secuencia sintética	
<400>	33	
	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcctgtca cccttgaca gcctgcctcc	60
	atctcctgca gatctagtca gagcattata aggaatgatg gaaacaccta tttggaatgg	120
	tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg aggctaattt atagagtttc caacaggttt	180
	tctgggggtcc cagacagatt ctctggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
	agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccc	300
	tacacctttg gaggaggac caaggtggag atcaaactg	339
20 <210>	34	
<211>	339	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
25 <223>	secuencia sintética	
<400>	34	

ES 2 719 548 T3

	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gcctgcctcc	60
	atctcctgca gatctagtca gagcattata aggaatgatg gaaacaccta tttggaatgg	120
	taccagcaga ggccaggcca atctccaagg aggctaattt atagagtttc caacagggtt	180
	tctggggtcc cagacagatt ctctggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
	agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccc	300
	tacacctttg gaggagggac caaggtggag atcaaacgt	339
	<210> 35	
	<211> 339	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética	
	<400> 35	
	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gcctgcctcc	60
	atctcctgca gatctagtca gagcattata aggaatgatg gaaacaccta tttggaatgg	120
	tttctgcaga ggccaggcca atctccaagg aggctaattt atagagtttc caacagggtt	180
	tctggggtcc cagacagatt ctctggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
	agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccc	300
	tacacctttg gaggagggac caaggtggag atcaaacgt	339
10	<210> 36	
	<211> 339	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia sintética	
	<400> 36	
	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gcctgcctcc	60
	atctcctgca gatctagtca gagcattata aggaatgatg gaaacaccta tttggaatgg	120
	tttcagcaga ggccaggcca atctccaaag aggctaattt atagagtttc caacagggtt	180
	tctggggtcc cagacagatt ctctggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
	agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccc	300
	tacacctttg gaggagggac caaggtggag atcaaacgt	339
	<210> 37	
	<211> 339	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética	
	<400> 37	

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gcctgcctcc 60
 atctcctgca gatctagtca gagcattata aggaatgatg gaaacaccta tttggaatgg 120
 ttccagcaga ggccaggcca atctccaagg ctccctaattt atagagtttc caacagggtt 180
 tctggggtcc cagacagatt ctctggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccc 300
 tacacctttg gaggagggac caaggtggag atcaaacgt 339
 <210> 38
 <211> 339
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia sintética
 <400> 38
 gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gcctgcctcc 60
 atctcctgca gatctagtca gagcattata aggaatgatg gaaacaccta tttggaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca atctccaaag ctccctaattt atagagtttc caacagggtt 180
 tctggggtcc cagacagatt ctctggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccc 300
 tacacctttg gaggagggac caaggtggag atcaaacgt 339
 10 <210> 39
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> mus músculo
 <400> 39
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Val
 1 5 10 15
 Ala Thr Ser Ser
 15 20
 <210> 40
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> mus músculo
 20 <400> 40
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Ile Gly
 1 5 10 15
 Ile Asn Ser
 <210> 41
 <211> 19
 <212> PRT
 25 <213> mus músculo
 <400> 41
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ala Gln Ala
 <210> 42
 <211> 106
 30 <212> PRT

ES 2 719 548 T3

<213> homo sapiens

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 43

<211> 330

<212> PRT

<213> homo sapiens

10 <400> 43

ES 2 719 548 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	

ES 2 719 548 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 44

<211> 329

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 44

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

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

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

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

ES 2 719 548 T3

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

<210> 45
 5 <211> 330

ES 2 719 548 T3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 45

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

ES 2 719 548 T3

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 46

<211> 329

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 46

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

ES 2 719 548 T3

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

- <210> 47
- <211> 120
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia sintética
- <400> 47

ES 2 719 548 T3

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Asn Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 48

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

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

ES 2 719 548 T3

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Asn Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 49

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Asn Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia sintética

<400> 50

ES 2 719 548 T3

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Val His Asn Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 51

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Asn Ile Glu Asp Tyr
20 25 30

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

ES 2 719 548 T3

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

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Val His Asn Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 52

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Val His Asn Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 53

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia sintética

<400> 53

ES 2 719 548 T3

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Val His Asn Ala His Tyr Gly Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 54

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

10

ES 2 719 548 T3

<210> 55
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> secuencia sintética
 <400> 55

```

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

      Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20          25          30

      Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

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

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

      Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85          90          95

      Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

      Arg
  
```

<210> 56
 10 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia sintética
 15 <400> 56

ES 2 719 548 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 57

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 57

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

ES 2 719 548 T3

<210> 58
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> secuencia sintética
 <400> 58

```

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

      Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
          20          25          30

      Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

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

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

      Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85          90          95

      Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

      Arg
  
```

<210> 59
 10 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia sintética
 15 <400> 59

ES 2 719 548 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 60

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 60

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 61
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> mus músculo
 5 <400> 61
 atgaaatgca gctgggtcat cttcttctg atggcagtg ttataggaat caattca 57
 <210> 62
 <211> 57
 <212> ADN
 10 <213> mus músculo
 <400> 62
 atgaagtgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgctac cagcagt 57
 <210> 63
 <211> 57
 15 <212> ADN
 <213> mus músculo
 <400> 63
 atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagca 57
 <210> 64
 20 <211> 324
 <212> ADN
 <213> homo sapiens
 <400> 64
 acgacgggtg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag 300
 25 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324
 <210> 65
 <211> 990
 <212> ADN
 30 <213> homo sapiens
 <400> 65

ES 2 719 548 T3

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtccctgacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag	720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	990

<210> 66

<211> 987

<212> ADN

5 <213> homo sapiens

<400> 66

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	420

ES 2 719 548 T3

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa ggcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 987

<210> 67

<211> 990

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 67

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagctg ccctgggtgt cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cactgaact cctgggggga 360
 ccgtgtgtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa ggcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

10

<210> 68

<211> 987

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 719 548 T3

<223> secuencia sintética

<400> 68

```

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagctg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc      120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      300
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga      360
ccgtgtgtct tcctcttccc cccaaaaacc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct      420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggatgag      720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccctg      840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca      960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggt      987

```

<210> 69

5 <211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

10 <400> 69

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcaca gactactata tgcactgggt gaggcaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg aaaatggtga tactgaatat      180
ggcccgaagt tccagggcag ggtcaccatg accagggaca cctccatcag cacagcctac      240
atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc cagacataat      300
gctcactacg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca      360

```

<210> 70

15 <211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

20 <400> 70

ES 2 719 548 T3

	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggata caccattgaa gactactata tgcactgggt gaggcaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg aaaatggtga tactgaatat	180
	ggcccgaagt tccagggcag ggtcaccatg accagggaca cctccatcaa cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc cagacataat	300
	gctcactacg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca	360
<210>	71	
<211>	360	
<212>	ADN	
5 <213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	secuencia sintética	
<400>	71	
	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggata caccttcaca gactactata tgcactgggt gaggcaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg aaaatggtga tactgaatat	180
	ggcccgaagt tccagggcaa ggccaccatg accgcagaca cctccatcag cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc cagacataat	300
	gctcactacg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca	360
10 <210>	72	
<211>	360	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
15 <223>	secuencia sintética	
<400>	72	
	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggact caccttcaca gactactata tgcactgggt gaggcaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg aaaatggtga tactgaatat	180
	ggcccgaagt tccagggcag ggtcaccatg accagggaca cctccatcag cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtac tgtccataat	300
	gctcactacg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca	360
20 <210>	73	
<211>	360	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
25 <223>	secuencia sintética	
<400>	73	

	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggact caacattgaa gactactata tgcactgggt gaggcaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gattggatgg attgatcctg aaaatgggtga tactgaatat	180
	ggcccgaagt tccagggcaa ggccaccatg accgcagaca cctccatcaa cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtac tgtccataat	300
	gctcactacg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca	360
<210>	74	
<211>	360	
<212>	ADN	
5 <213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	secuencia sintética	
<400>	74	
	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggact caccattgaa gactactata tgcactgggt gaggcaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg aaaatgggtga tactgaatat	180
	ggcccgaagt tccagggcag ggtcaccatg accagggaca cctccatcag cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc cgtccataat	300
	gctcactacg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca	360
10 <210>	75	
<211>	360	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
15 <223>	secuencia sintética	
<400>	75	
	cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
	tcctgcaagg cttctggact caccattgaa gactactata tgcactgggt gaggcaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg attgatcctg aaaatgggtga tactgaatat	180
	ggcccgaagt tccagggcag ggtcaccatg accagggaca cctccatcaa cacagcctac	240
	atggagctga gcaggctgag atctgatgac acagctgtgt attactgtgc cgtccataat	300
	gctcactacg ggacctggtt tgcttactgg ggccaaggaa ccctggtcac agtctcctca	360
20 <210>	76	
<211>	370	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
25 <223>	secuencia sintética	
<400>	76	

ES 2 719 548 T3

gatgttctgg attcctgcta ccagcagtga tgttgtgatg actcagtctc cactctccct 60
gcctgtcacc cttggacagc ctgcctccat ctctgcaga tctagtcaga gccttttaca 120
cagtagtgga aacacctatt tagaatggtt tcagcagagg ccaggccaat ctccaaggag 180
gctaatttat aaaatttcca cccgattttc tgggggccca gacagattct ctggcagtgg 240
gtcaggcact gatttcacac tgaaaatcag cagggtggag gctgaggatg ttggggttta 300
ttactgcttt caaggttcac atgttcccta cacctttgga ggagggacca aggtggagat 360
caaacgtacg 370

<210> 77

<211> 370

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 77

gatgttctgg attcctgcta ccagcagtga tgttgtgatg actcagtctc cactctccct 60
gcctgtcacc cttggacagc ctgcctccat ctctgcaga tctagtcaga gccttttaca 120
cagtagtgga aacacctatt tagaatggtt ccagcagagg ccaggccaat ctccaaggag 180
gctaatttat aaaatttcca cccgattttc tgggggccca gacagattct ctggcagtgg 240
gtcaggcact gatttcacac tgaaaatcag cagggtggag gctgaggatg ttggggttta 300
ttactgcttt caaggttcac atgttcccta cacctttgga ggagggacca aggtggagat 360
caaacgtacg 370

10 <210> 78

<211> 370

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia sintética

<400> 78

gatgttctgg attcctgcta ccagcagtga tgttgtgatg actcagtctc cactctccct 60
gcctgtcacc cttggacagc ctgcctccat ctctgcaga tctagtcaga gccttttaca 120
cagtagtgga aacacctatt tagaatggtt tctgcagagg ccaggccaat ctccaaggag 180
gctaatttat aaaatttcca cccgattttc tgggggccca gacagattct ctggcagtgg 240
gtcaggcact gatttcacac tgaaaatcag cagggtggag gctgaggatg ttggggttta 300
ttactgcttt caaggttcac atgttcccta cacctttgga ggagggacca aggtggagat 360
caaacgtacg 370

<210> 79

<211> 370

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 79

	gatgttctgg attcctgcta ccagcagtga tgttgtgatg actcagtcct cactctccct	60
	gcctgtcacc cttggacagc ctgcctccat ctctgcaga tctagtcaga gccttttaca	120
	cagtagtgga aacacctatt tagaatgggt tcagcagagg ccaggccaat ctccaaagag	180
	gctaatttat aaaatttcca cccgattttc tgggggtcca gacagattct ctggcagtgg	240
	gtcaggcact gatttcacac tgaaaatcag cagggtggag gctgaggatg ttggggttta	300
	ttactgcttt caaggttcac atgttcccta cacctttgga ggagggacca aggtggagat	360
	caaacgtacg	370
	<210> 80	
	<211> 370	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética	
	<400> 80	
	gatgttctgg attcctgcta ccagcagtga tgttgtgatg actcagtcct cactctccct	60
	gcctgtcacc cttggacagc ctgcctccat ctctgcaga tctagtcaga gccttttaca	120
	cagtagtgga aacacctatt tagaatgggt tcagcagagg ccaggccaat ctccaaaggc	180
	cctaatttat aaaatttcca cccgattttc tgggggtcca gacagattct ctggcagtgg	240
	gtcaggcact gatttcacac tgaaaatcag cagggtggag gctgaggatg ttggggttta	300
10	ttactgcttt caaggttcac atgttcccta cacctttgga ggagggacca aggtggagat	360
	caaacgtacg	370
	<210> 81	
	<211> 339	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia sintética	
	<400> 81	
	gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gcctgcctcc	60
	atctcctgca gatctagtca gagcctttta cacagtagtg gaaacaccta tttagaatgg	120
	tacctgcaga ggccaggcca atctccaaag cccctaattt ataaaatttc caccogattt	180
	tctgggggtcc cagacagatt ctctggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
	agcagggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgct ttcaaggttc acatgttccc	300
	tacacctttg gaggaggac caaggtggag atcaaacgt	339
20	<210> 82	
	<211> 339	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> secuencia sintética	
	<400> 82	

ES 2 719 548 T3

```

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcctgtca cccttggaca gcctgcctcc      60
atctcctgca gatctagtca gagcctttta cacagtagtg gaaacaccta tttagaatgg      120
taccagcaga ggccaggcca atctccaagg cccctaattt ataaaatttc cacccgattt      180
tctgggggtcc cagacagatt ctctggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc      240
agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccc      300
tacacctttg gaggagggac caaggtggag atcaaacgt      339

```

<210> 83

<211> 755

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 83

```

Met Ala Arg Lys Leu Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr Phe Ala Leu Ser
1           5           10           15

```

```

Val Thr Asn Pro Leu His Glu Leu Lys Ala Ala Ala Phe Pro Gln Thr
          20           25           30

```

ES 2 719 548 T3

Thr Glu Lys Ile Ser Pro Asn Trp Glu Ser Gly Ile Asn Val Asp Leu
 35 40 45
 Ala Ile Ser Thr Arg Gln Tyr His Leu Gln Gln Leu Phe Tyr Arg Tyr
 50 55 60
 Gly Glu Asn Asn Ser Leu Ser Val Glu Gly Phe Arg Lys Leu Leu Gln
 65 70 75 80
 Asn Ile Gly Ile Asp Lys Ile Lys Arg Ile His Ile His His Asp His
 85 90 95
 Asp His His Ser Asp His Glu His His Ser Asp His Glu Arg His Ser
 100 105 110
 Asp His Glu His His Ser Glu His Glu His His Ser Asp His Asp His
 115 120 125
 His Ser His His Asn His Ala Ala Ser Gly Lys Asn Lys Arg Lys Ala
 130 135 140
 Leu Cys Pro Asp His Asp Ser Asp Ser Ser Gly Lys Asp Pro Arg Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Gly Lys Gly Ala His Arg Pro Glu His Ala Ser Gly Arg Arg
 165 170 175
 Asn Val Lys Asp Ser Val Ser Ala Ser Glu Val Thr Ser Thr Val Tyr
 180 185 190
 Asn Thr Val Ser Glu Gly Thr His Phe Leu Glu Thr Ile Glu Thr Pro
 195 200 205
 Arg Pro Gly Lys Leu Phe Pro Lys Asp Val Ser Ser Ser Thr Pro Pro
 210 215 220
 Ser Val Thr Ser Lys Ser Arg Val Ser Arg Leu Ala Gly Arg Lys Thr
 225 230 235 240
 Asn Glu Ser Val Ser Glu Pro Arg Lys Gly Phe Met Tyr Ser Arg Asn
 245 250 255
 Thr Asn Glu Asn Pro Gln Glu Cys Phe Asn Ala Ser Lys Leu Leu Thr
 260 265 270
 Ser His Gly Met Gly Ile Gln Val Pro Leu Asn Ala Thr Glu Phe Asn

ES 2 719 548 T3

275	280	285
Tyr Leu Cys Pro Ala Ile Ile Asn Gln Ile Asp Ala Arg Ser Cys Leu		
290	295	300
Ile His Thr Ser Glu Lys Lys Ala Glu Ile Pro Pro Lys Thr Tyr Ser		
305	310	315 320
Leu Gln Ile Ala Trp Val Gly Gly Phe Ile Ala Ile Ser Ile Ile Ser		
	325	330 335
Phe Leu Ser Leu Leu Gly Val Ile Leu Val Pro Leu Met Asn Arg Val		
	340	345 350
Phe Phe Lys Phe Leu Leu Ser Phe Leu Val Ala Leu Ala Val Gly Thr		
	355	360 365
Leu Ser Gly Asp Ala Phe Leu His Leu Leu Pro His Ser His Ala Ser		
	370	375 380
His His His Ser His Ser His Glu Glu Pro Ala Met Glu Met Lys Arg		
385	390	395 400
Gly Pro Leu Phe Ser His Leu Ser Ser Gln Asn Ile Glu Glu Ser Ala		
	405	410 415
Tyr Phe Asp Ser Thr Trp Lys Gly Leu Thr Ala Leu Gly Gly Leu Tyr		
	420	425 430
Phe Met Phe Leu Val Glu His Val Leu Thr Leu Ile Lys Gln Phe Lys		
	435	440 445
Asp Lys Lys Lys Lys Asn Gln Lys Lys Pro Glu Asn Asp Asp Asp Val		
	450	455 460
Glu Ile Lys Lys Gln Leu Ser Lys Tyr Glu Ser Gln Leu Ser Thr Asn		
465	470	475 480
Glu Glu Lys Val Asp Thr Asp Asp Arg Thr Glu Gly Tyr Leu Arg Ala		
	485	490 495
Asp Ser Gln Glu Pro Ser His Phe Asp Ser Gln Gln Pro Ala Val Leu		
	500	505 510
Glu Glu Glu Glu Val Met Ile Ala His Ala His Pro Gln Glu Val Tyr		
	515	520 525

ES 2 719 548 T3

```

Asn Glu Tyr Val Pro Arg Gly Cys Lys Asn Lys Cys His Ser His Phe
530                               535                               540

His Asp Thr Leu Gly Gln Ser Asp Asp Leu Ile His His His His Asp
545                               550                               555                               560

Tyr His His Ile Leu His His His His His Gln Asn His His Pro His
565                               570                               575

Ser His Ser Gln Arg Tyr Ser Arg Glu Glu Leu Lys Asp Ala Gly Val
580                               585                               590

Ala Thr Leu Ala Trp Met Val Ile Met Gly Asp Gly Leu His Asn Phe
595                               600                               605

Ser Asp Gly Leu Ala Ile Gly Ala Ala Phe Thr Glu Gly Leu Ser Ser
610                               615                               620

Gly Leu Ser Thr Ser Val Ala Val Phe Cys His Glu Leu Pro His Glu
625                               630                               635                               640

Leu Gly Asp Phe Ala Val Leu Leu Lys Ala Gly Met Thr Val Lys Gln
645                               650                               655

Ala Val Leu Tyr Asn Ala Leu Ser Ala Met Leu Ala Tyr Leu Gly Met
660                               665                               670

Ala Thr Gly Ile Phe Ile Gly His Tyr Ala Glu Asn Val Ser Met Trp
675                               680                               685

Ile Phe Ala Leu Thr Ala Gly Leu Phe Met Tyr Val Ala Leu Val Asp
690                               695                               700

Met Val Pro Glu Met Leu His Asn Asp Ala Ser Asp His Gly Cys Ser
705                               710                               715                               720

Arg Trp Gly Tyr Phe Phe Leu Gln Asn Ala Gly Met Leu Leu Gly Phe
725                               730                               735

Gly Ile Met Leu Leu Ile Ser Ile Phe Glu His Lys Ile Val Phe Arg
740                               745                               750

Ile Asn Phe
755

```

<210> 84
 <211> 749
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 84

ES 2 719 548 T3

Met Ala Arg Lys Leu Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr Phe Ala Leu Ser
1 5 10 15

Val Thr Asn Pro Leu His Glu Leu Lys Ala Ala Ala Phe Pro Gln Thr
20 25 30

Thr Glu Lys Ile Ser Pro Asn Trp Glu Ser Gly Ile Asn Val Asp Leu
35 40 45

Ala Ile Ser Thr Arg Gln Tyr His Leu Gln Gln Leu Phe Tyr Arg Tyr
50 55 60

Gly Glu Asn Asn Ser Leu Ser Val Glu Gly Phe Arg Lys Leu Leu Gln
65 70 75 80

Asn Ile Gly Ile Asp Lys Ile Lys Arg Ile His Ile His His Asp His
85 90 95

Asp His His Ser Asp His Glu His His Ser Asp His Glu Arg His Ser
100 105 110

Asp His Glu His His Ser Asp His Glu His His Ser Asp His Asn His
115 120 125

Ala Ala Ser Gly Lys Asn Lys Arg Lys Ala Leu Cys Pro Asp His Asp
130 135 140

Ser Asp Ser Ser Gly Lys Asp Pro Arg Asn Ser Gln Gly Lys Gly Ala
145 150 155 160

His Arg Pro Glu His Ala Ser Gly Arg Arg Asn Val Lys Asp Ser Val
165 170 175

Ser Ala Ser Glu Val Thr Ser Thr Val Tyr Asn Thr Val Ser Glu Gly
180 185 190

Thr His Phe Leu Glu Thr Ile Glu Thr Pro Arg Pro Gly Lys Leu Phe
195 200 205

Pro Lys Asp Val Ser Ser Ser Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Lys Ser
210 215 220

Arg Val Ser Arg Leu Ala Gly Arg Lys Thr Asn Glu Ser Val Ser Glu
225 230 235 240

ES 2 719 548 T3

Pro Arg Lys Gly Phe Met Tyr Ser Arg Asn Thr Asn Glu Asn Pro Gln
 245 250 255
 Glu Cys Phe Asn Ala Ser Lys Leu Leu Thr Ser His Gly Met Gly Ile
 260 265 270
 Gln Val Pro Leu Asn Ala Thr Glu Phe Asn Tyr Leu Cys Pro Ala Ile
 275 280 285
 Ile Asn Gln Ile Asp Ala Arg Ser Cys Leu Ile His Thr Ser Glu Lys
 290 295 300
 Lys Ala Glu Ile Pro Pro Lys Thr Tyr Ser Leu Gln Ile Ala Trp Val
 305 310 315 320
 Gly Gly Phe Ile Ala Ile Ser Ile Ile Ser Phe Leu Ser Leu Leu Gly
 325 330 335
 Val Ile Leu Val Pro Leu Met Asn Arg Val Phe Phe Lys Phe Leu Leu
 340 345 350
 Ser Phe Leu Val Ala Leu Ala Val Gly Thr Leu Ser Gly Asp Ala Phe
 355 360 365
 Leu His Leu Leu Pro His Ser His Ala Ser His His His Ser His Ser
 370 375 380
 His Glu Glu Pro Ala Met Glu Met Lys Arg Gly Pro Leu Phe Ser His
 385 390 395 400
 Leu Ser Ser Gln Asn Ile Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Asp Ser Thr Trp
 405 410 415
 Lys Gly Leu Thr Ala Leu Gly Gly Leu Tyr Phe Met Phe Leu Val Glu
 420 425 430
 His Val Leu Thr Leu Ile Lys Gln Phe Lys Asp Lys Lys Lys Lys Asn
 435 440 445
 Gln Lys Lys Pro Glu Asn Asp Asp Asp Val Glu Ile Lys Lys Gln Leu
 450 455 460
 Ser Lys Tyr Glu Ser Gln Leu Ser Thr Asn Glu Glu Lys Val Asp Thr
 465 470 475 480
 Asp Asp Arg Thr Glu Gly Tyr Leu Arg Ala Asp Ser Gln Glu Pro Ser
 485 490 495

ES 2 719 548 T3

His Phe Asp Ser Gln Gln Pro Ala Val Leu Glu Glu Glu Glu Val Met
 500 505 510
 Ile Ala His Ala His Pro Gln Glu Val Tyr Asn Glu Tyr Val Pro Arg
 515 520 525
 Gly Cys Lys Asn Lys Cys His Ser His Phe His Asp Thr Leu Gly Gln
 530 535 540
 Ser Asp Asp Leu Ile His His His His Asp Tyr His His Ile Leu His
 545 550 555 560
 His His His His Gln Asn His His Pro His Ser His Ser Gln Arg Tyr
 565 570 575
 Ser Arg Glu Glu Leu Lys Asp Ala Gly Val Ala Thr Leu Ala Trp Met
 580 585 590
 Val Ile Met Gly Asp Gly Leu His Asn Phe Ser Asp Gly Leu Ala Ile
 595 600 605
 Gly Ala Ala Phe Thr Glu Gly Leu Ser Ser Gly Leu Ser Thr Ser Val
 610 615 620
 Ala Val Phe Cys His Glu Leu Pro His Glu Leu Gly Asp Phe Ala Val
 625 630 635 640
 Leu Leu Lys Ala Gly Met Thr Val Lys Gln Ala Val Leu Tyr Asn Ala
 645 650 655
 Leu Ser Ala Met Leu Ala Tyr Leu Gly Met Ala Thr Gly Ile Phe Ile
 660 665 670
 Gly His Tyr Ala Glu Asn Val Ser Met Trp Ile Phe Ala Leu Thr Ala
 675 680 685
 Gly Leu Phe Met Tyr Val Ala Leu Val Asp Met Val Pro Glu Met Leu
 690 695 700
 His Asn Asp Ala Ser Asp His Gly Cys Ser Arg Trp Gly Tyr Phe Phe
 705 710 715 720
 Leu Gln Asn Ala Gly Met Leu Leu Gly Phe Gly Ile Met Leu Leu Ile
 725 730 735
 Ser Ile Phe Glu His Lys Ile Val Phe Arg Ile Asn Phe

740

745

<210> 85
 5 <211> 741
 <212> PRT

ES 2 719 548 T3

<213> Macaca fascicularis

<400> 85

```

Met Ala Arg Lys Leu Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr Phe Thr Leu Ser
 1          5          10          15

Val Thr Asn Pro Leu His Glu Leu Lys Ser Ala Ala Ala Phe Pro Gln
          20          25          30

Thr Thr Glu Lys Ile Ser Pro Asn Trp Glu Ser Gly Ile Asn Val Asp
 35          40          45

Leu Ala Ile Thr Thr Arg Gln Tyr His Leu Gln Gln Leu Phe Tyr Arg
 50          55          60

Tyr Gly Glu Asn Asn Ser Leu Ser Val Glu Gly Phe Arg Lys Leu Leu
 65          70          75          80

Gln Asn Ile Gly Ile Asp Lys Ile Lys Arg Ile His Ile His His Asp
          85          90          95

His Asp His His Ser Asp His Glu His His Ser Asp His Glu His His
          100          105          110

Ser Asp His Glu His His Ser His Arg Asn His Ala Ala Ser Gly Lys
          115          120          125

Asn Lys Arg Lys Ala Leu Cys Pro Glu His Asp Ser Asp Ser Ser Gly
          130          135          140

Lys Asp Pro Arg Asn Ser Gln Gly Lys Gly Ala His Arg Pro Glu His
          145          150          155          160

Ala Asn Gly Arg Arg Asn Val Lys Asp Ser Val Ser Thr Ser Glu Val
          165          170          175

Thr Ser Thr Val Tyr Asn Thr Val Ser Glu Gly Thr His Phe Leu Glu
          180          185          190

Thr Ile Glu Thr Pro Lys Leu Phe Pro Lys Asp Val Ser Ser Ser Thr
          195          200          205

Pro Pro Ser Val Thr Glu Lys Ser Leu Val Ser Arg Leu Ala Gly Arg

```

ES 2 719 548 T3

210		215		220
Lys Thr Asn Glu Ser Met Ser Glu Pro Arg Lys Gly Phe Met Tyr Ser				
225		230		240
Arg Asn Thr Asn Glu Asn Pro Gln Glu Cys Phe Asn Ala Ser Lys Leu				
	245		250	255
Leu Thr Ser His Gly Met Gly Ile Gln Val Pro Leu Asn Ala Thr Glu				
	260		265	270
Phe Asn Tyr Leu Cys Pro Ala Ile Ile Asn Gln Ile Asp Ala Arg Ser				
	275		280	285
Cys Leu Ile His Thr Ser Glu Lys Lys Ala Glu Ile Pro Pro Lys Thr				
	290		295	300
Tyr Ser Leu Gln Ile Ala Trp Val Gly Gly Phe Ile Ala Ile Ser Ile				
305		310		320
Ile Ser Phe Leu Ser Leu Leu Gly Val Ile Leu Val Pro Leu Met Asn				
	325		330	335
Arg Val Phe Phe Lys Phe Leu Leu Ser Phe Leu Val Ala Leu Ala Val				
	340		345	350
Gly Thr Leu Ser Gly Asp Ala Phe Leu His Leu Leu Pro His Ser His				
	355		360	365
Ala Ser His His His Ser His Ser His Glu Glu Pro Ala Met Glu Met				
	370		375	380
Lys Arg Gly Pro Leu Phe Ser His Leu Ser Ser Gln Asn Ile Glu Glu				
385		390		400
Ser Ala Tyr Phe Asp Ser Thr Trp Lys Gly Leu Thr Ala Leu Gly Gly				
	405		410	415
Leu Tyr Phe Met Phe Leu Val Glu His Val Leu Thr Leu Ile Lys Gln				
	420		425	430
Phe Lys Asp Lys Lys Lys Lys Asn Gln Lys Lys Pro Glu Asn Asp Asp				
	435		440	445
Asp Val Glu Ile Lys Lys Gln Leu Ser Lys Tyr Glu Ser Gln Leu Ser				
	450		455	460

ES 2 719 548 T3

Thr	Asn	Glu	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	Thr	Glu	Gly	Tyr	Leu	465	470	475	480
Arg	Ala	Asp	Ser	Gln	Glu	Pro	Ser	His	Phe	Asp	Ser	Gln	Gln	Pro	Ala	485	490	495	
Ile	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Met	Ile	Ala	His	Ala	His	Pro	Gln	Glu	500	505	510	
Val	Tyr	Asn	Glu	Tyr	Val	Pro	Arg	Gly	Cys	Lys	Asn	Lys	Cys	His	Ser	515	520	525	
His	Phe	His	Asp	Thr	Leu	Gly	Gln	Ser	Asp	Asp	Leu	Ile	His	His	His	530	535	540	
His	Asp	Tyr	His	His	Ile	Leu	His	His	His	His	His	Gln	Asn	His	His	545	550	555	560
Pro	His	Ser	His	Ser	Gln	Arg	Tyr	Ser	Arg	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	565	570	575	
Gly	Ile	Ala	Thr	Leu	Ala	Trp	Met	Val	Ile	Met	Gly	Asp	Gly	Leu	His	580	585	590	
Asn	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Gly	Leu	595	600	605	
Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Ala	Val	Phe	Cys	His	Glu	Leu	Pro	610	615	620	
His	Glu	Leu	Gly	Asp	Phe	Ala	Val	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly	Met	Thr	Val	625	630	635	640
Lys	Gln	Ala	Val	Leu	Tyr	Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Met	Leu	Ala	Tyr	Leu	645	650	655	
Gly	Met	Ala	Thr	Gly	Ile	Phe	Ile	Gly	His	Tyr	Ala	Glu	Asn	Val	Ser	660	665	670	
Met	Trp	Ile	Phe	Ala	Leu	Thr	Ala	Gly	Leu	Phe	Met	Tyr	Val	Ala	Leu	675	680	685	
Val	Asp	Met	Val	Pro	Glu	Met	Leu	His	Asn	Asp	Ala	Ser	Asp	His	Gly	690	695	700	
Cys	Ser	Arg	Trp	Gly	Tyr	Phe	Phe	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Met	Leu	Leu	705	710	715	720

ES 2 719 548 T3

Gly Phe Gly Ile Met Leu Leu Ile Ser Ile Phe Glu His Lys Ile Val
725 730 735

Phe Arg Ile Asn Phe
740

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 10 y una región variable de cadena ligera madura que
5 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 15.
2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, donde la región variable de cadena pesada madura se fusiona con una región constante de cadena pesada y la región variable de cadena ligera madura se fusiona con una
10 región constante de cadena ligera.
3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 2, donde la región constante de cadena pesada es una forma mutante de la región constante humana natural que tiene una unión reducida a un receptor de Fcγ en
relación con la región constante humana natural.
- 15 4. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 2 o 3, donde la región constante de cadena pesada es de isotipo IgG1.
5. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 2, donde la región constante de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8 (S239C) y la región constante de
20 cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 4.
6. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el anticuerpo se conjuga con un agente citotóxico o citostático.
- 25 7. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 6, donde el agente es MMAE o MMAF.
8. Un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican una región variable de cadena pesada madura y una región variable de cadena ligera madura tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 9. Un anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de pacientes que tienen o están en riesgo de cáncer.
10. El anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical o melanoma.
35
11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

```

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

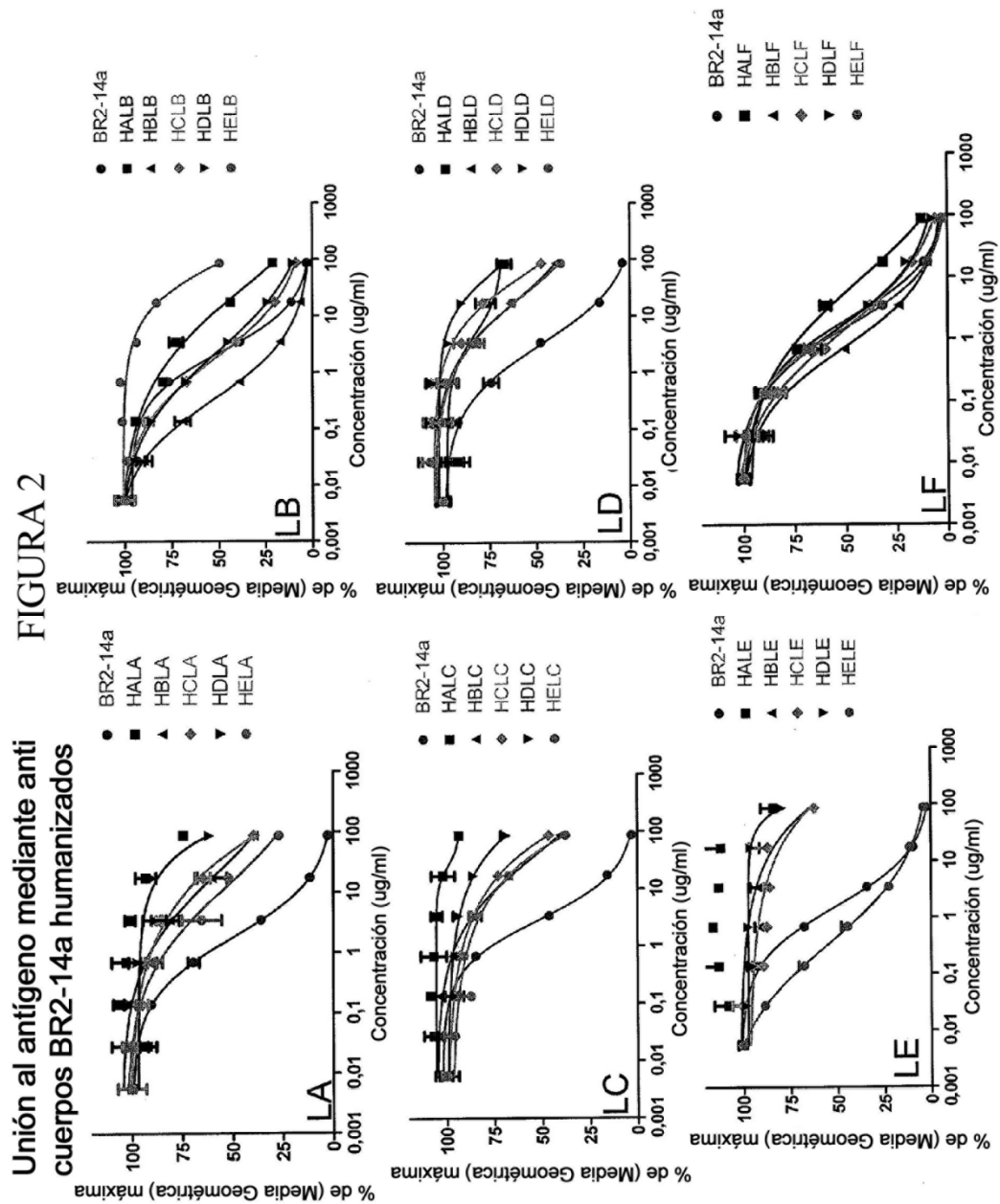
      60      70      80      90     100     110
hLiv-14 HA APTFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARHDAHGTWTFAYWGQGLTVTVSS
hLiv-14 HB .....N.....
hLiv-14 HC .....KA...A.....
hLiv-14 HD .....NV.....
hLiv-14 HE .....KA...A...N.....NV.....
BR2-14a .....KA...A...SN...LQ..S.T.E.....NV.....A
CDRs .....*****.....

      10      20      30      40      50
hLiv-14 LA DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRF
hLiv-14 LB .....Y.....
hLiv-14 LC .....L.....
hLiv-14 LD .....K.....
hLiv-14 LE .....L.....
hLiv-14 LF .....YL.K....KL.....
BR2-14a ..L...T.....S..DQ.....YL.K....KL.....
CDRs .....*****.....

      60      70      80      90     100
hLiv14 LA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKVEIKR
hLiv14 LB .....
hLiv14 LC .....
hLiv14 LD .....
hLiv14 LE .....
hLiv14 LF .....
BR2-14a .....L.....L.....
CDRs * .....*****

```

FIGURA 1



Unión de competencia en células MCF-7 ATCC

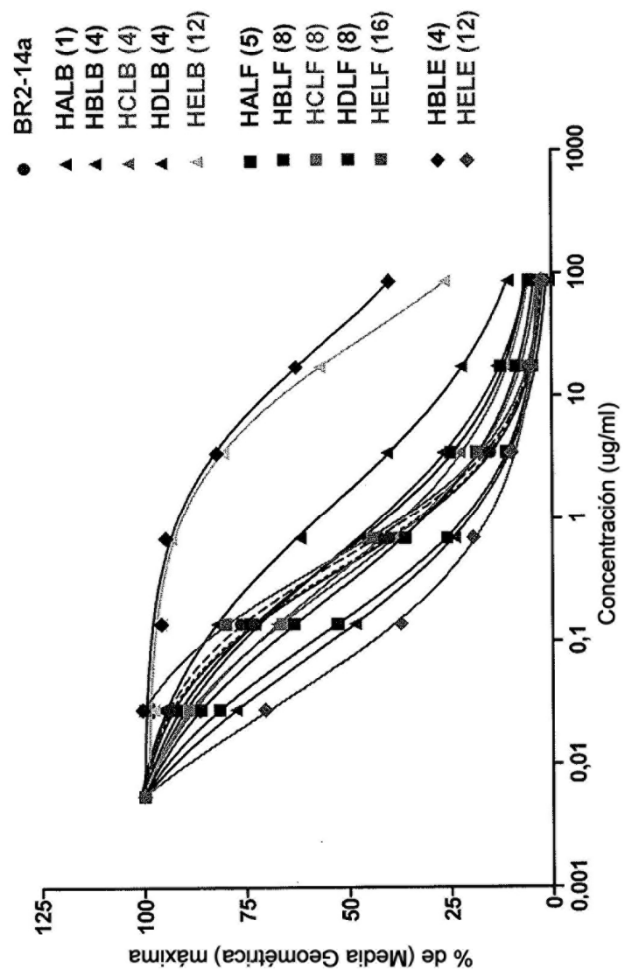
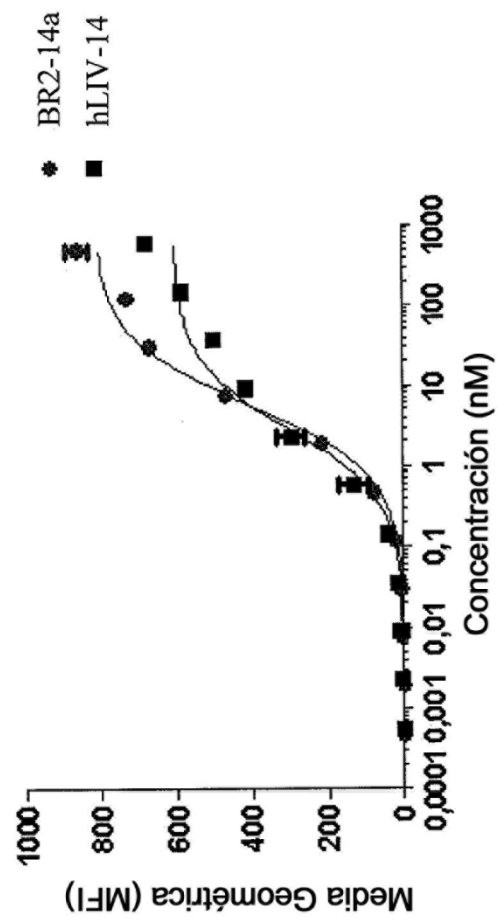


FIGURA 3

FIGURA 4



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

Unión de competencia en acervo de CHO hLIV1

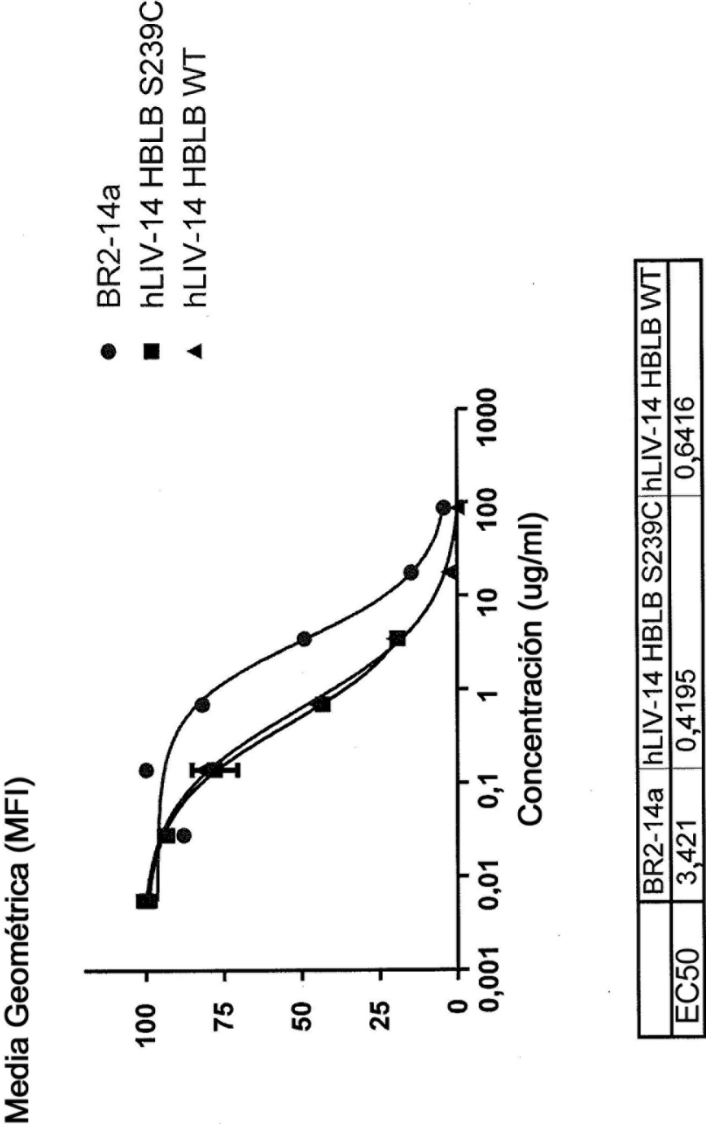


FIGURA 5

Alta expresión de LIV-1 en cánceres de mama con tratamiento pos-hormonal

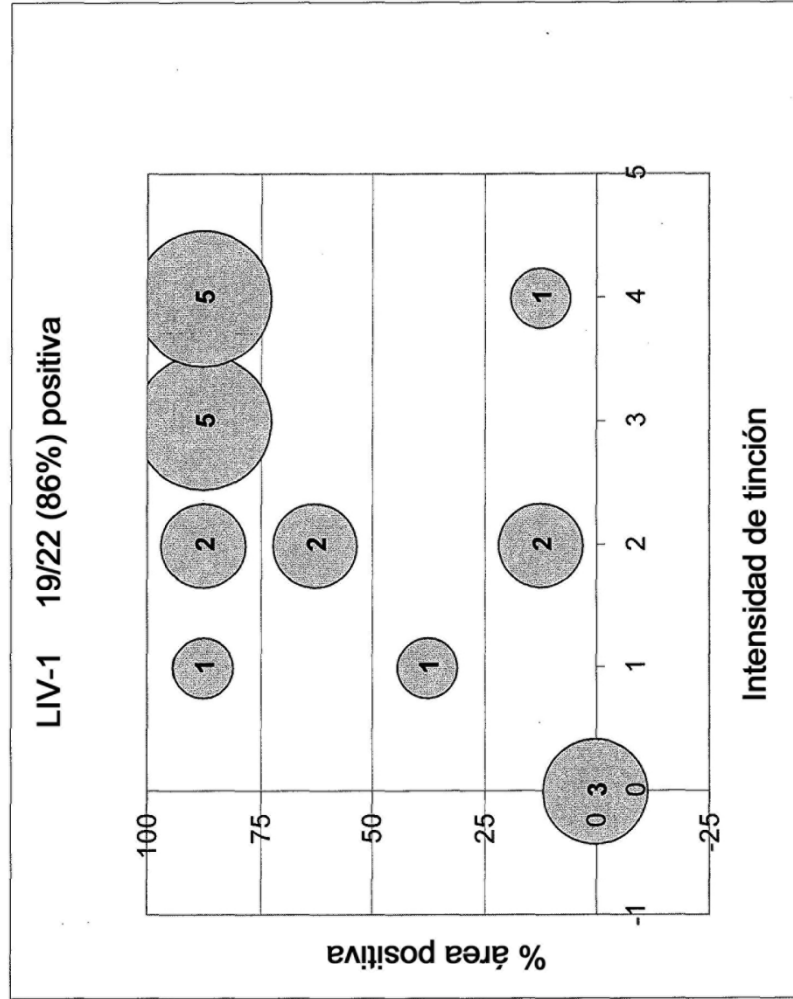


FIGURA 6

- Muestras de lesiones primarias y metastásicas de pacientes tratados previamente con terapia hormonal, incluidos tamoxifeno e inhibidores de aromatasa
- Muestras de tejido de 5 fuentes comerciales

Expresión de LIV-1 en cáncer de próstata metastásico refractario hormonal (clasificado por sitio)

	LIV-1	
	#	%
Número total de muestras + (intensidad 1-4+)	36/50	72
Mets óseos	15/25	60
Mets de tejido blando	21/25	82

FIGURA 7

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

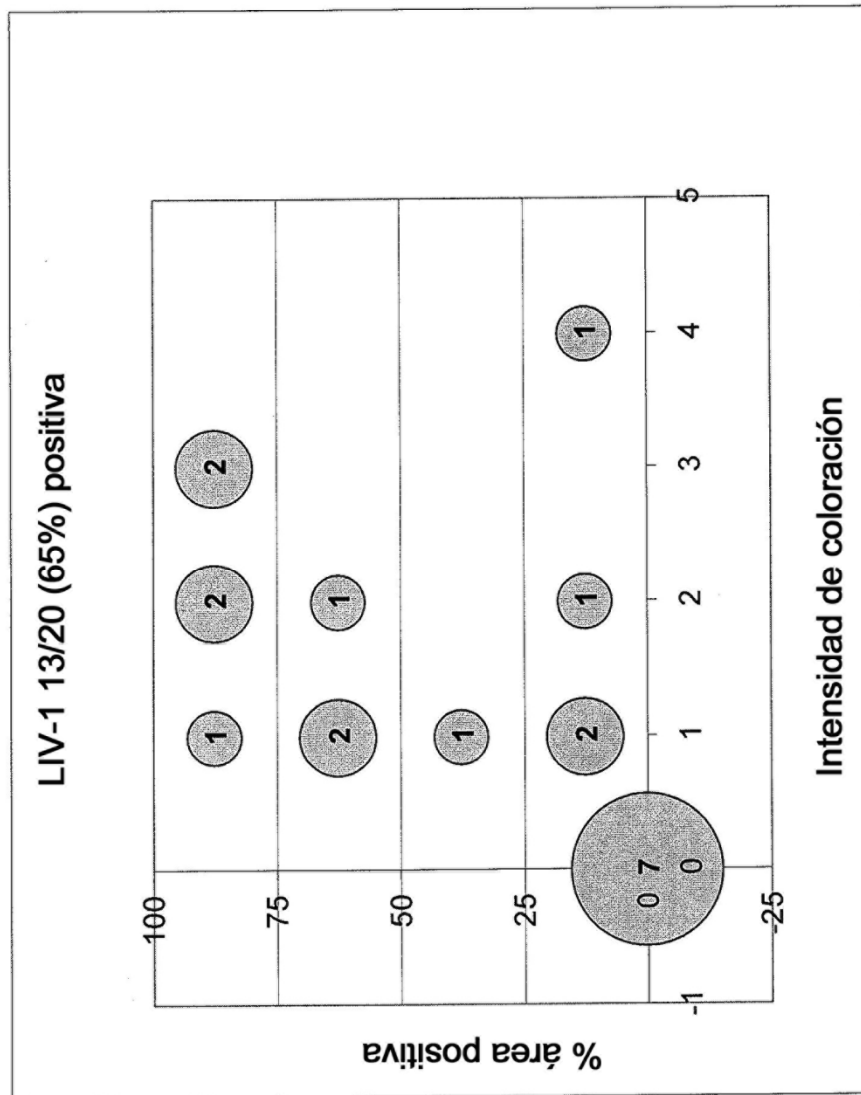
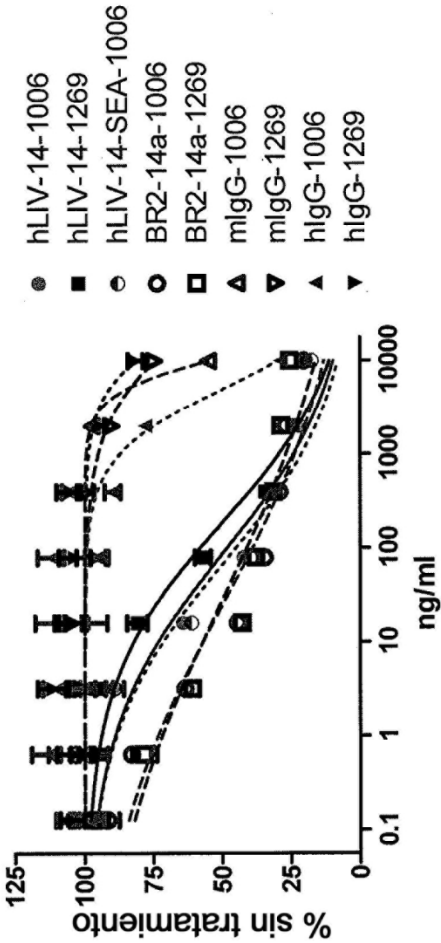


FIGURA 8

Actividad citotóxica de hLIV-14 ADC
Células MCF-7 (ATCC). 144 horas de tratamiento

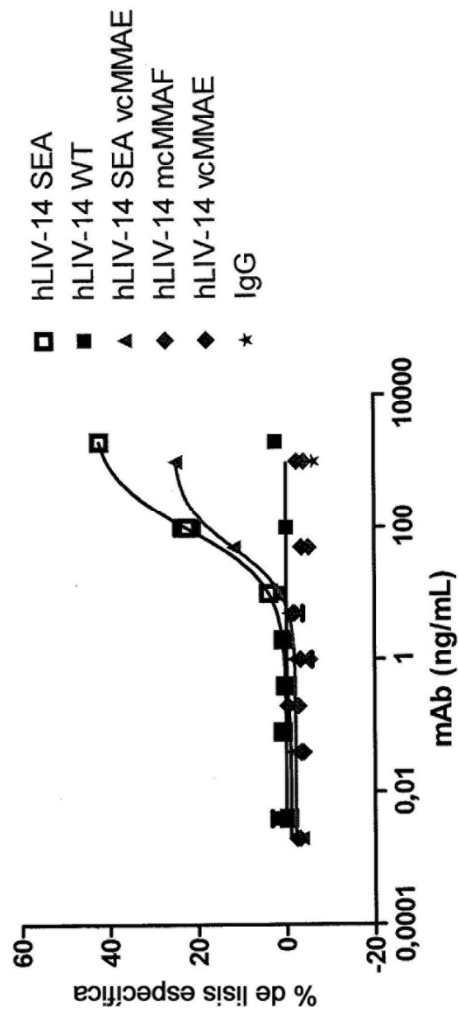


	hLIV-14-1006	hLIV-14-SEA-1006	BR2-14a-1-1006	hlgG-1006	mlgG-1006	hLIV-14-1269	BR2-14a-1269	hlgG-1269	mlgG-1269
CI50 ng/ml	91	91	20	>10 000	4786	195	20	>10 000	>10 000

FIGURA 9

Actividad de ADCC: hLIV14 SEA y ADC (Donante 1)

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

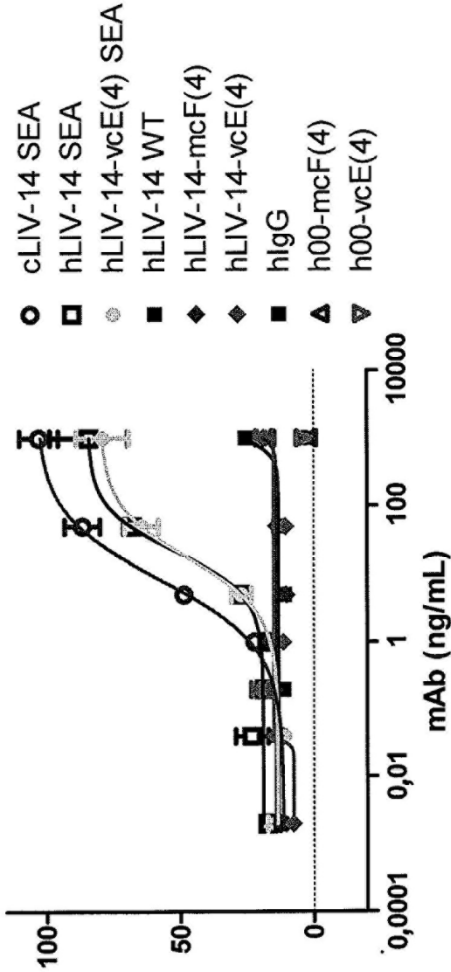


	CI50 (ng/mL)	Lisis máx.
hLIV-14 SEA	97,1	44%
hLIV-14 SEA vcMMAE	49,9	26%

FIGURA 10

Actividad de ADCC: hLIV14 SEA y ADC (Donante 2)

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



	CI50 (ng/mL)	Lisis máx.
hLIV-14 SEA	21,8	85%
hLIV-14 SEA vcMMAE	17,0	80%

FIGURA 11

Actividad antitumoral de ADC de LIV-14 química en MCF7 Carcinoma de mama en ratones desnudos

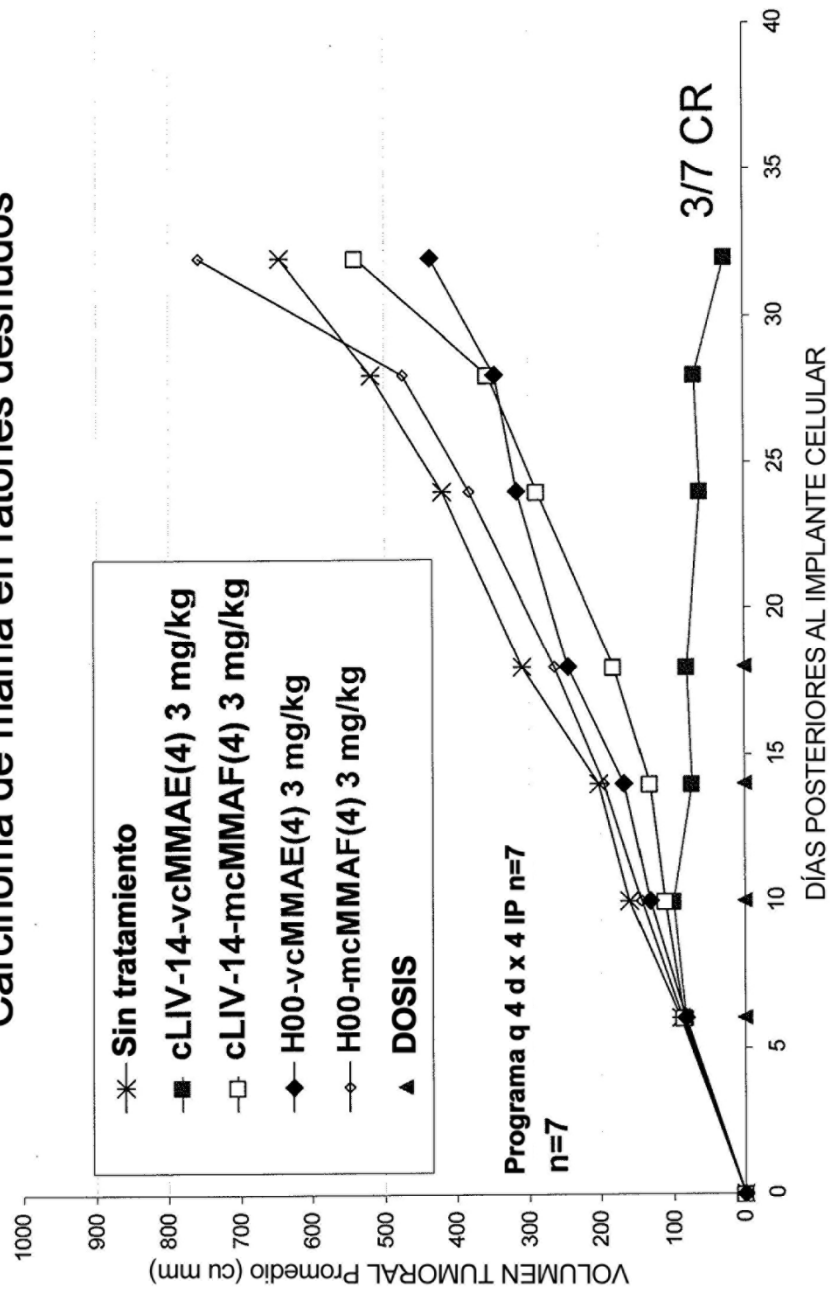


FIGURA 12

Actividad antitumoral de LIV-14-vcMMAE en PC3 quimérica
Carcinoma de próstata (ATCC) en ratones macho desnudos

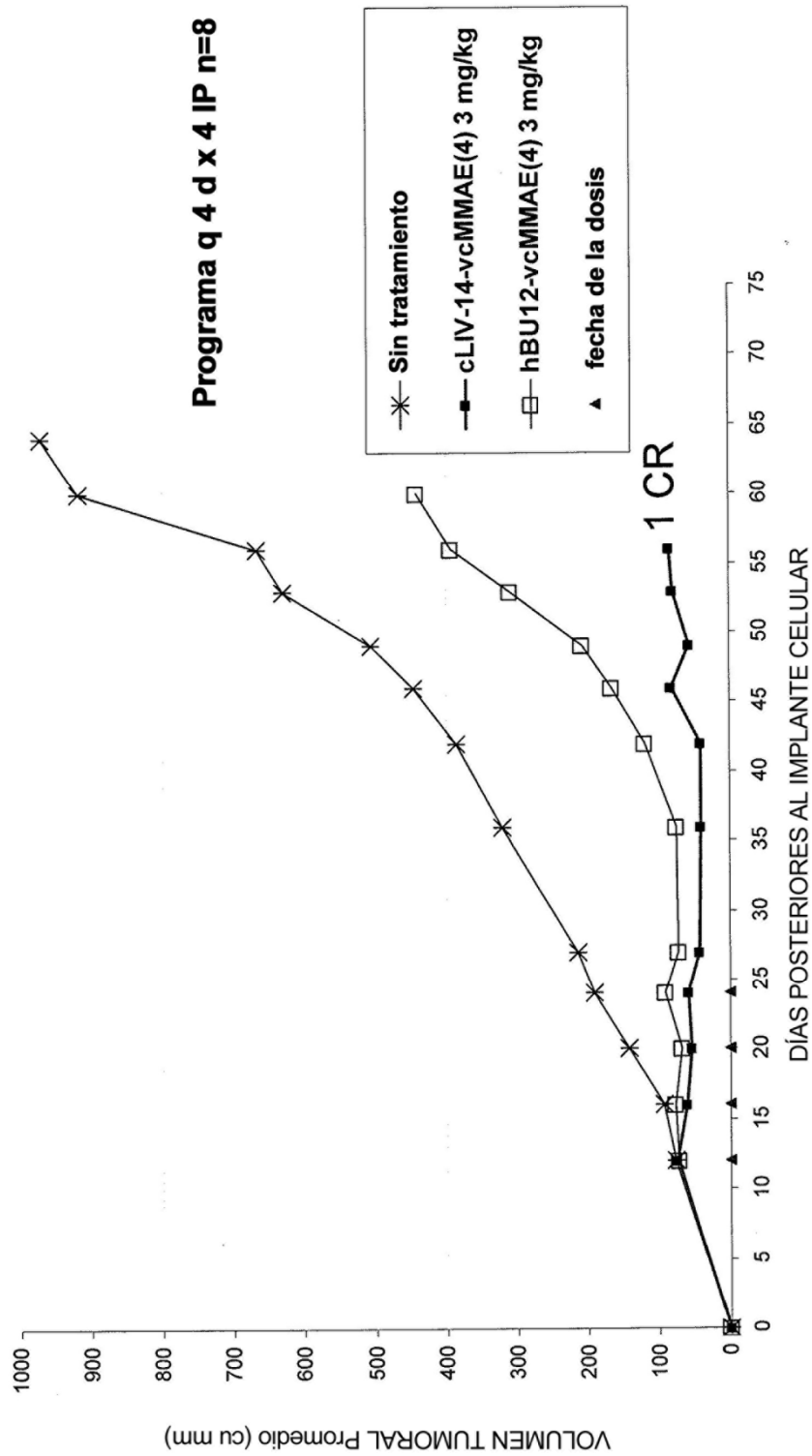


FIGURA 13

FIGURA 14

Actividad de LIV-14 ADC humanizada en tumores carcinoides de
mama MCF7 (NCI) en ratones desnudos

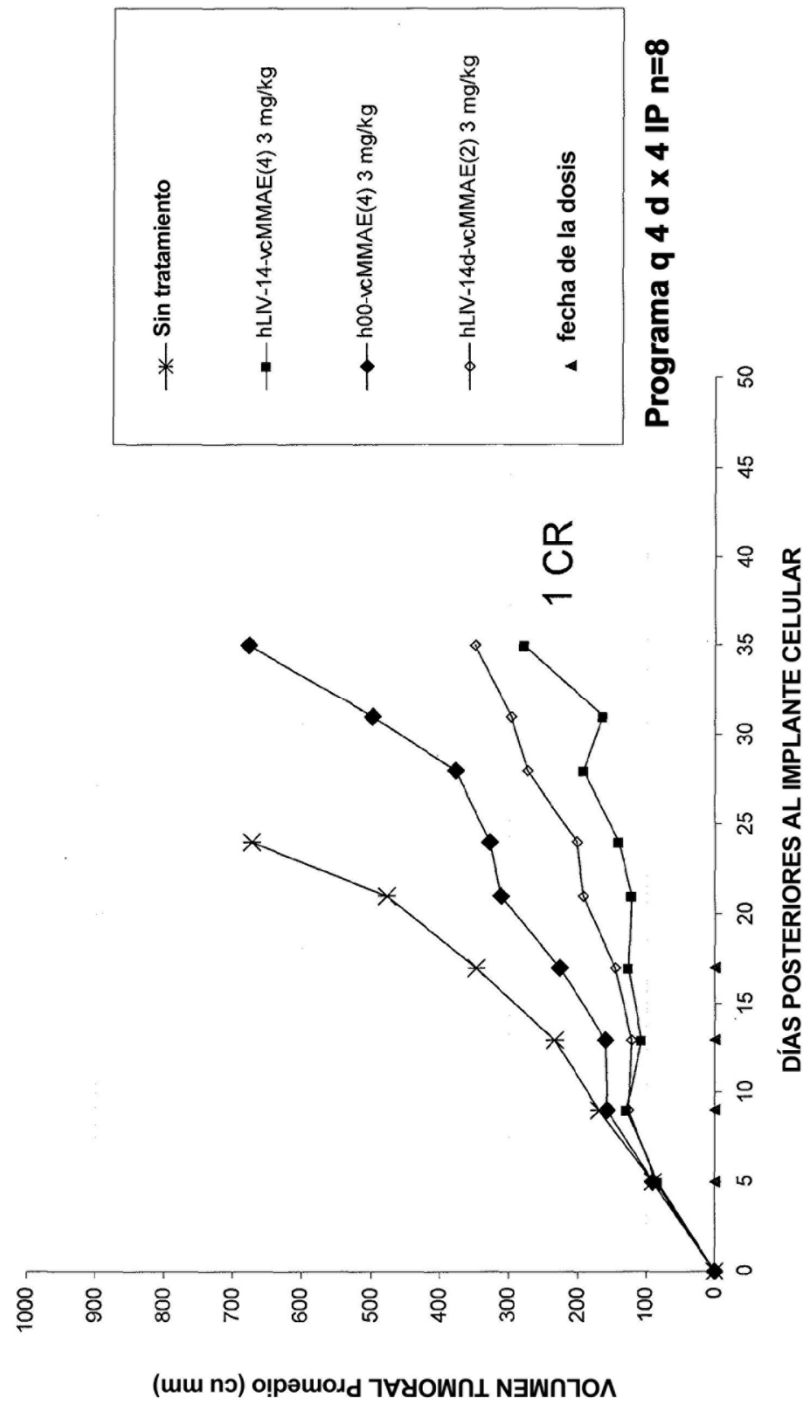
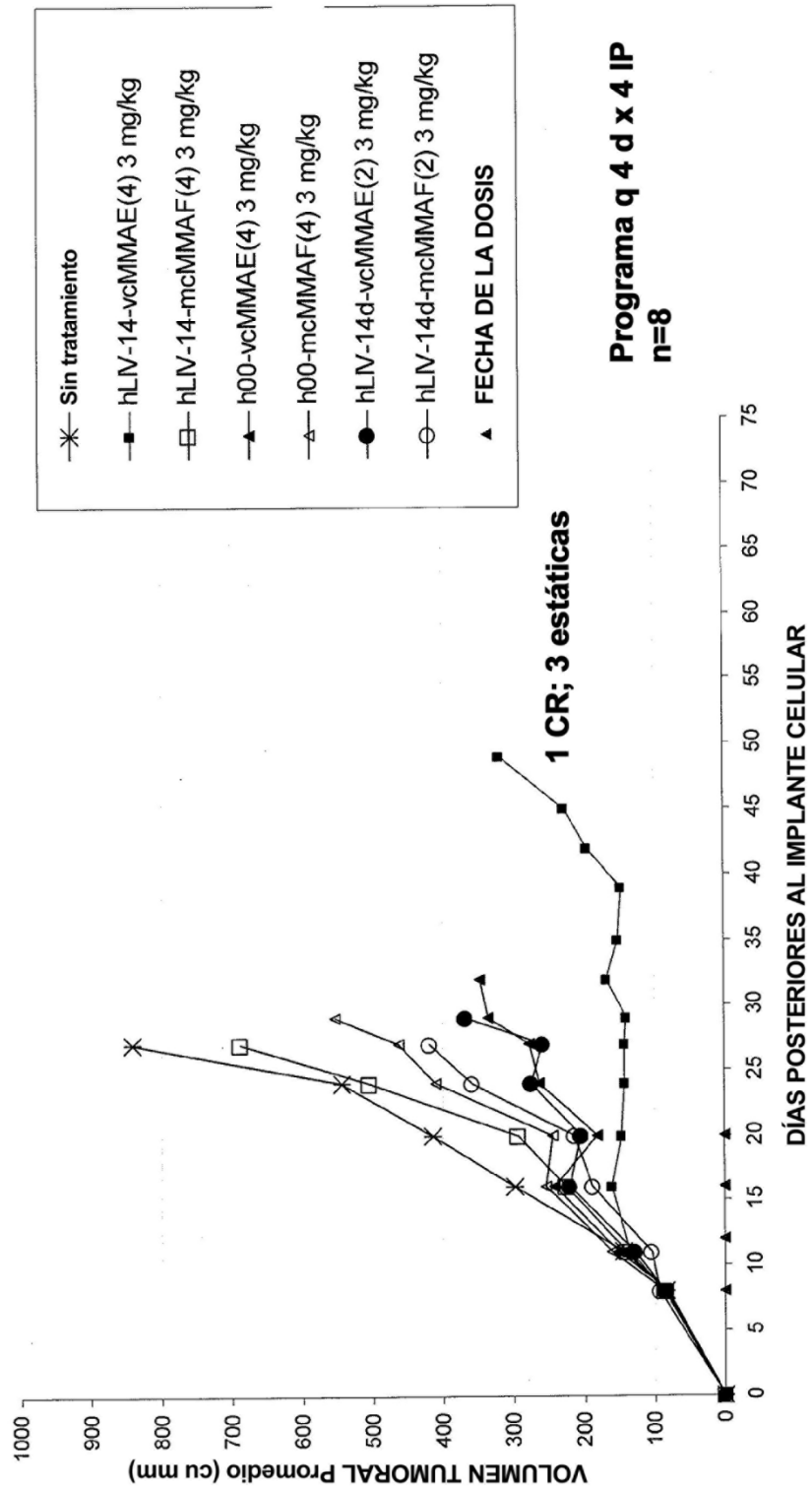


FIGURA 15

Actividad de LIV-14 ADC humanizada en PC3 (DSMZ)
Tumores carcinoides de próstata en ratones hembra desnudos



```

          10      20      30      40      50
hLiv22 HA QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT EY
hLiv22 HB .....IE.....
hLiv22 HC .....
hLiv22 HD .....L.....
hLiv22 HE .....LNIE.....I.....
hLiv22 HF .....L.IE.....
hLiv22 HG .....L.IE.....
mLiv22 H E...Q....LVRS....L..T...LNIE.....K.R.E....I.....
CDRs          *****

          60      70      80      90      100      110
hLiv22 HA GPKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARHNAHYGTWFA YWGQGTLVTVSS
hLiv22 HB .....N.....
hLiv22 HC .....KA...A.....
hLiv22 HD .....TV.....
hLiv22 HE .....KA...A...N.....TV.....
hLiv22 HF .....V.....
hLiv22 HG .....N.....V.....
mLiv22 H .....KA...A...SN...LQ..S.T.G.....TV.....A
CDRs          *****

hLiv22 HA
hLiv22 HB
hLiv22 HC
hLiv22 HD
hLiv22 HE
hLiv22 HF
hLiv22 HG
hLiv22 H

```

FIGURA 16A

		10	20	30	40	50	
							
hLiv22	LA	DVVM	TQSPLSLP	VTLGQ	PASISCRSSQ	SLHSSGNTYLEWFQ	QORPGQSPRRLIYKISTR
hLiv22	LB	Y.....					
hLiv22	LC	L.....					
hLiv22	LD	K.....					
hLiv22	LE	P.....					
hLiv22	LF	YL.....KP.....					
hLiv22	LG	Y.....P.....					
mLiv22	L	..L..	T.....S..	DQ.....	YL.....	KP.....	
CDRs		*****					

		60	70	80	90	100	
							
hLiv22	LA	SGVP	DRFSGSG	SGTDFTL	KISRVEA	EDVG	VYYCFQGS
hLiv22	LB						
hLiv22	LC						
hLiv22	LD						
hLiv22	LE						
hLiv22	LF						
hLiv22	LG						
mLiv22	L	L.L.....L.....					
CDRs		*	*****				

FIGURA 16B

Humanización de unión al antígeno hLIV22 fase 2 agrupada por cadena H

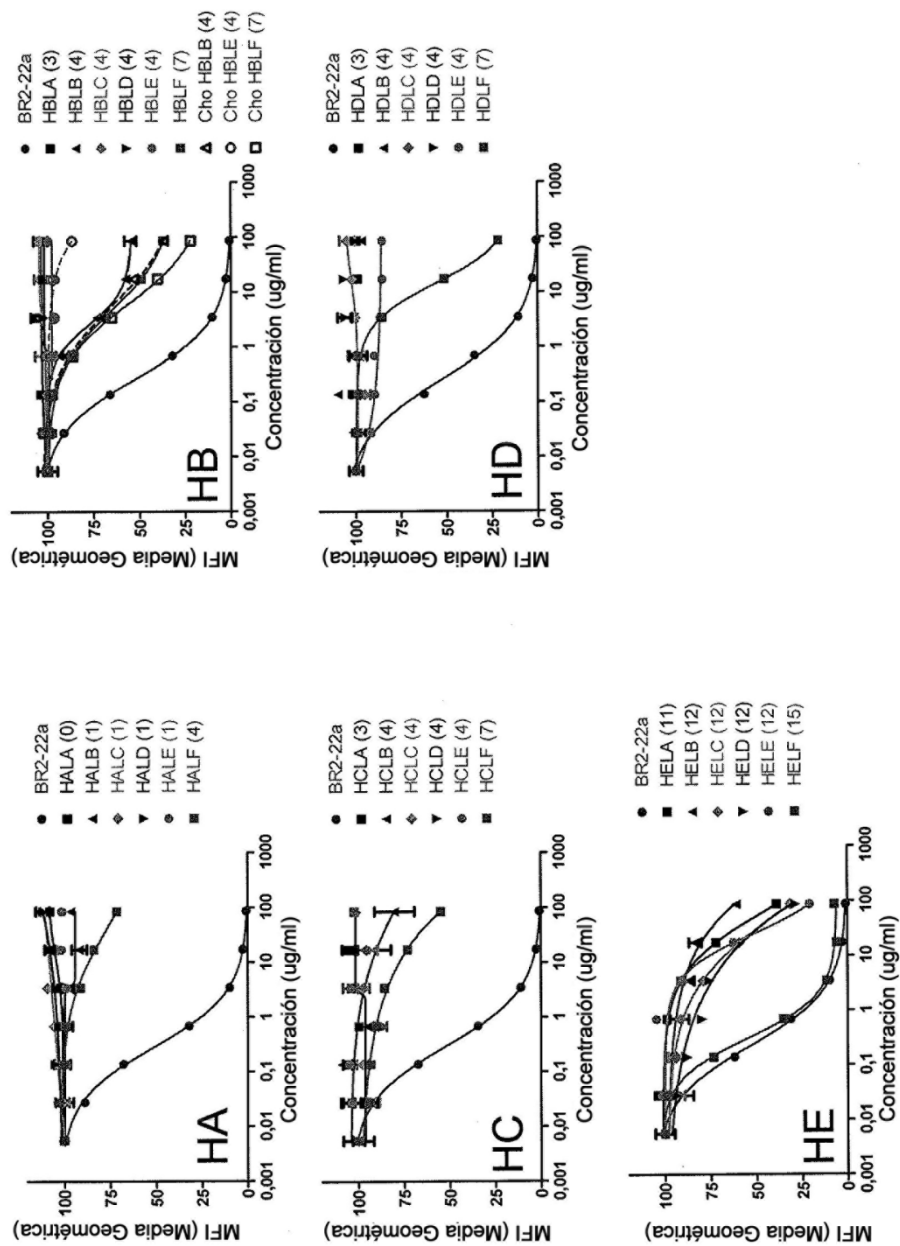


FIGURA 17

Retromutaciones de LIV22 (fase 2)

	nº de de retromutaciones										nº de de retromutaciones									
	L36	L37	L45	L46		H27	H28	H29	H30	H48	H66	H67	H71	H76	H93	H94				
LA	F	Q	R	R	0	HA	Y	T	F	T	M	R	V	R	S	A	R	0		
LB	Y	Q	R	R	1	HB	Y	T	I	(E)	M	R	V	R	N	A	R	3		
LC	F	F	R	R	1	HC	Y	T	F	T	M	K	A	A	S	A	R	3		
LD	F	Q	R	R	1	HD	L	T	F	T	M	R	V	R	S	I	V	3		
LE	F	Q	R	P	1	HE	L	N	I	(E)	I	K	A	A	N	I	V	11		
LF	Y	L	K	P	4															

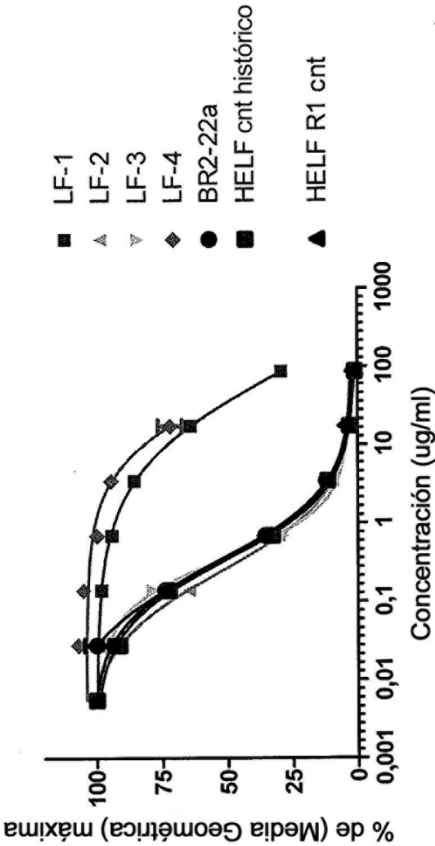
Retromutaciones de LIV22 (fase 3)

		nº de de retromutaciones		nº de de retromutaciones														
		L36	L37	L45	L46		H27	H28	H29	H30	H48	H66	H67	H71	H76	H93	H94	
LF	Y	Y	L	K	P	HE	L	N	I	(E)	I	K	A	A	N	I	V	11
LF-1	F	F	L	K	P	HE-1	Y	N	I	(E)	I	K	A	A	N	I	V	10
LF-2	Y	Y	Q	K	P	HE-2	L	T	I	(E)	I	K	A	A	N	I	V	10
LF-3	Y	Y	L	R	P	HE-3	L	N	F	(E)	I	K	A	A	N	I	V	10
LF-4	Y	Y	L	K	R	HE-4	L	N	I	T	I	K	A	A	N	I	V	10
						HE-5	L	N	I	(E)	M	K	A	A	N	I	V	10
						HE-6	L	N	I	(E)	I	R	A	A	N	I	V	10
						HE-7	L	N	I	(E)	I	K	V	A	N	I	V	10
						HE-8	L	N	I	(E)	I	K	A	R	N	I	V	10
						HE-9	L	N	I	(E)	I	K	A	A	S	I	V	10
						HE-10	L	N	I	(E)	I	K	A	A	N	A	V	10
						HE-11	L	N	I	(E)	I	K	A	A	N	I	R	10

FIGURA 18

FIGURA 18

Unión de competencia de hLIV22: LF (fase 3)



Retromutaciones de LIV22 adicionales: LF

	L36	L37	L45	L46	nº de retromutaciones
LF	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	4
LF-1	F	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>P</u>	3
LF-2	Y	Q	<u>K</u>	<u>P</u>	3
LF-3	<u>Y</u>	<u>L</u>	R	<u>P</u>	3
LF-4	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	R	3

residuos para mantener la unión al antígeno:
Y36 (tirosina) y P46 (prolina)

FIGURA 19

Unión de competencia hLIV22: HE (fase 3)

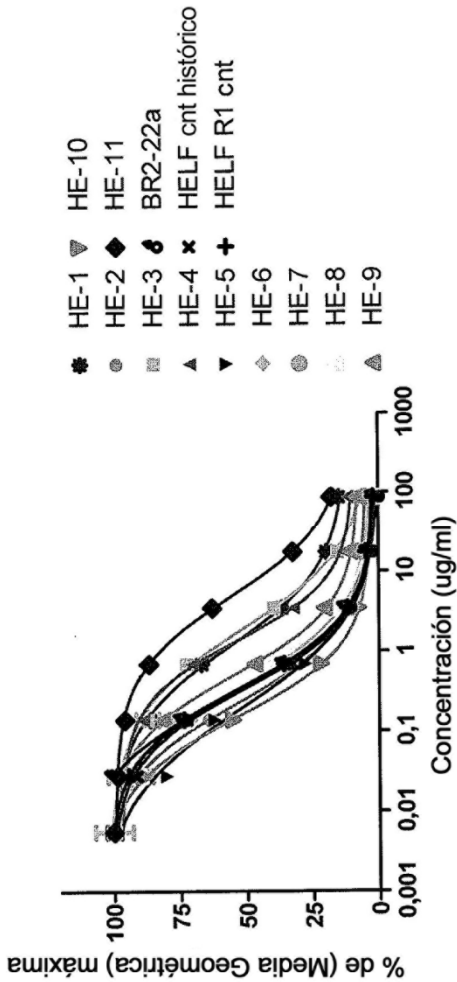


FIGURA 20

Retromutaciones de hLIV22 adicionales: HE

	H27	H28	H29	H30	H48	H66	H67	H71	H76	H93	H94	nº de retromutaciones
HE	L	N	I	E	I	K	A	A	N	I	V	11
HE-1	Y	N	I	E	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-2	L	T	I	E	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-3	L	N	F	E	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-4	L	N	I	T	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-5	L	N	I	E	M	K	A	A	N	I	V	10
HE-6	L	N	I	E	I	R	A	A	N	I	V	10
HE-7	L	N	I	E	I	K	V	A	N	I	V	10
HE-8	L	N	I	E	I	K	A	A	N	I	V	10
HE-9	L	N	I	E	I	K	A	A	S	I	V	10
HE-10	L	N	I	E	I	K	A	A	N	A	V	10
HE-11	L	N	I	E	I	K	A	A	N	I	R	10

residuos para mantener la unión al antígeno:

L27 (leucina)

I29 (isoleucina)

E30 (ácido glutámico)

N76 (asparagina)

V94 (valina)

Humanización de LIV22: Fase 4

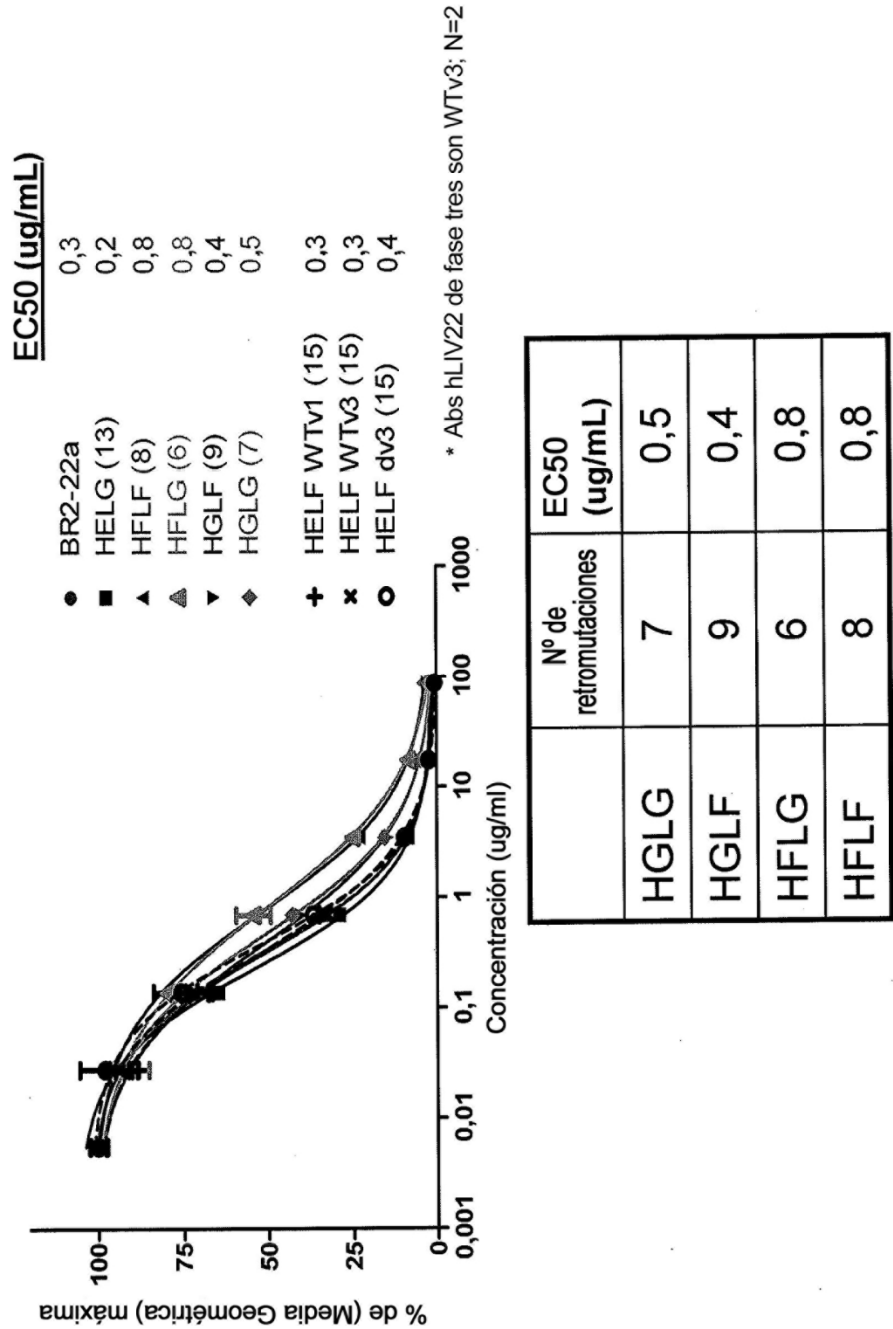
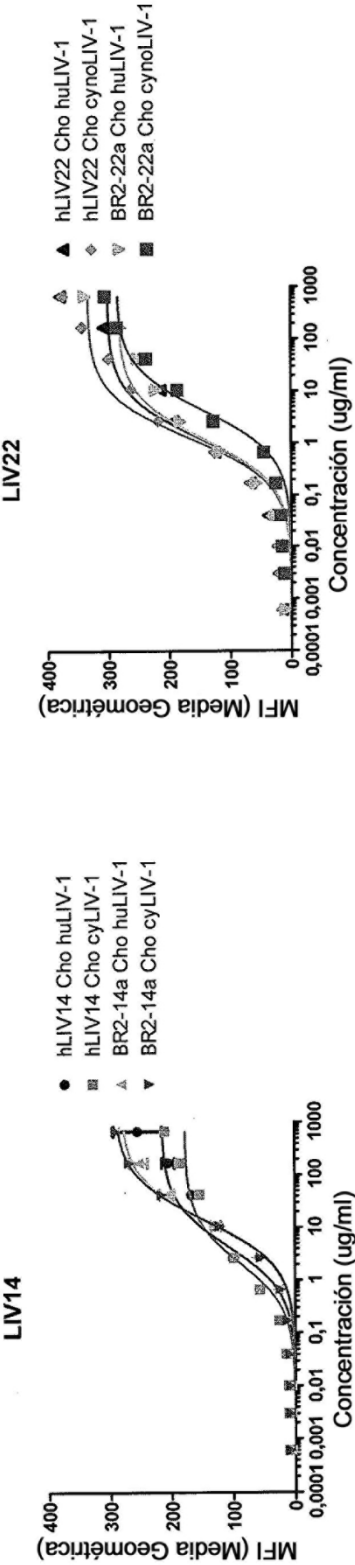


FIGURA 21

Unión de saturación
AF-647



Kd (nM) aparente de BR2-14a, BR2-22a, hLIV14 y hLIV14 para LIV-1 cyno y humana

antígeno	BR-14a	hLIV14	BR-22a	hLIV22
LIV1 humana	12,5	4,3	1,2	1,2
LIV1 cyno	14,0	2,1	4,2	1,3

Control negativo: m2H12

FIGURA 22

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

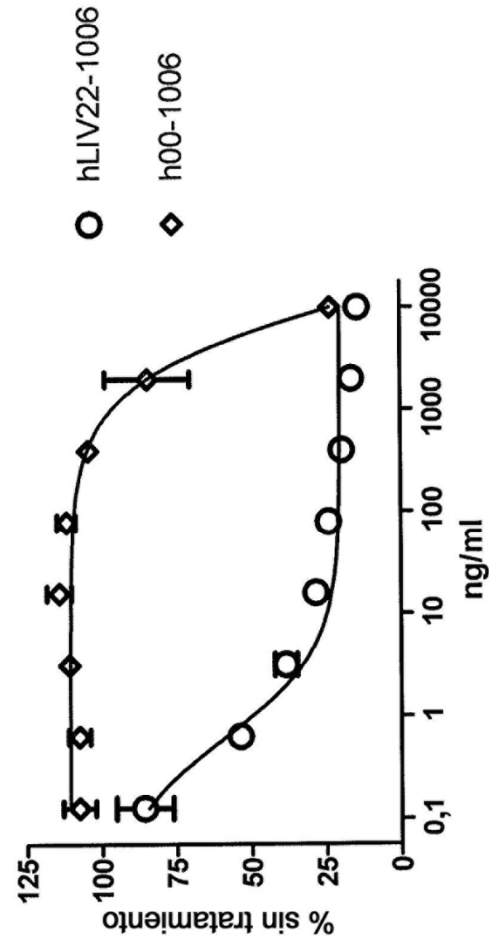


Tabla EC50. Promedio de 2 experimentos

	EC50 (ng/ml)
hLIV22 -1006	0,9
h00 -1006	4981

FIGURA 23

Actividad citotóxica de hLIV22-mcMMAE
Células MCF-7 (ATCC). 144 horas de tratamiento

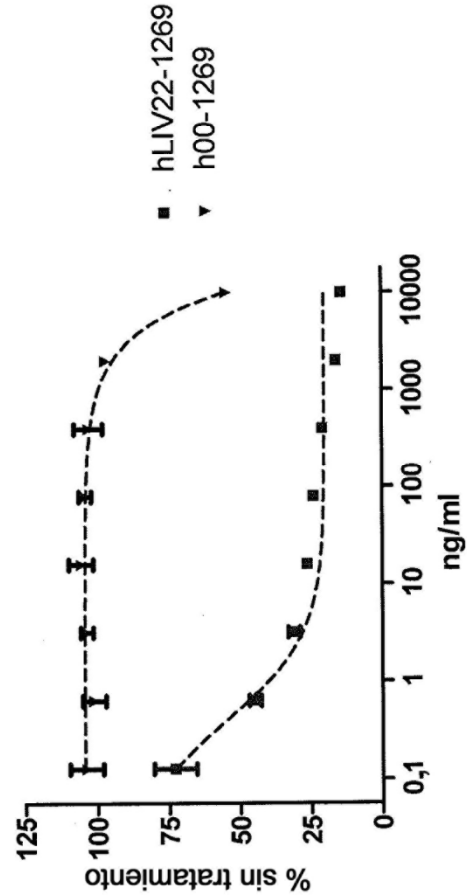


Tabla EC50. Promedio de 2 experimentos

-1269 ADC	EC50 (ng/ml)
hLIV22	0,7
h00	>10000

FIGURA 24

Actividad de hLIV22 ADC en carcinoma de próstata PC3(dsmz) Modelo en ratones hembra desnudos

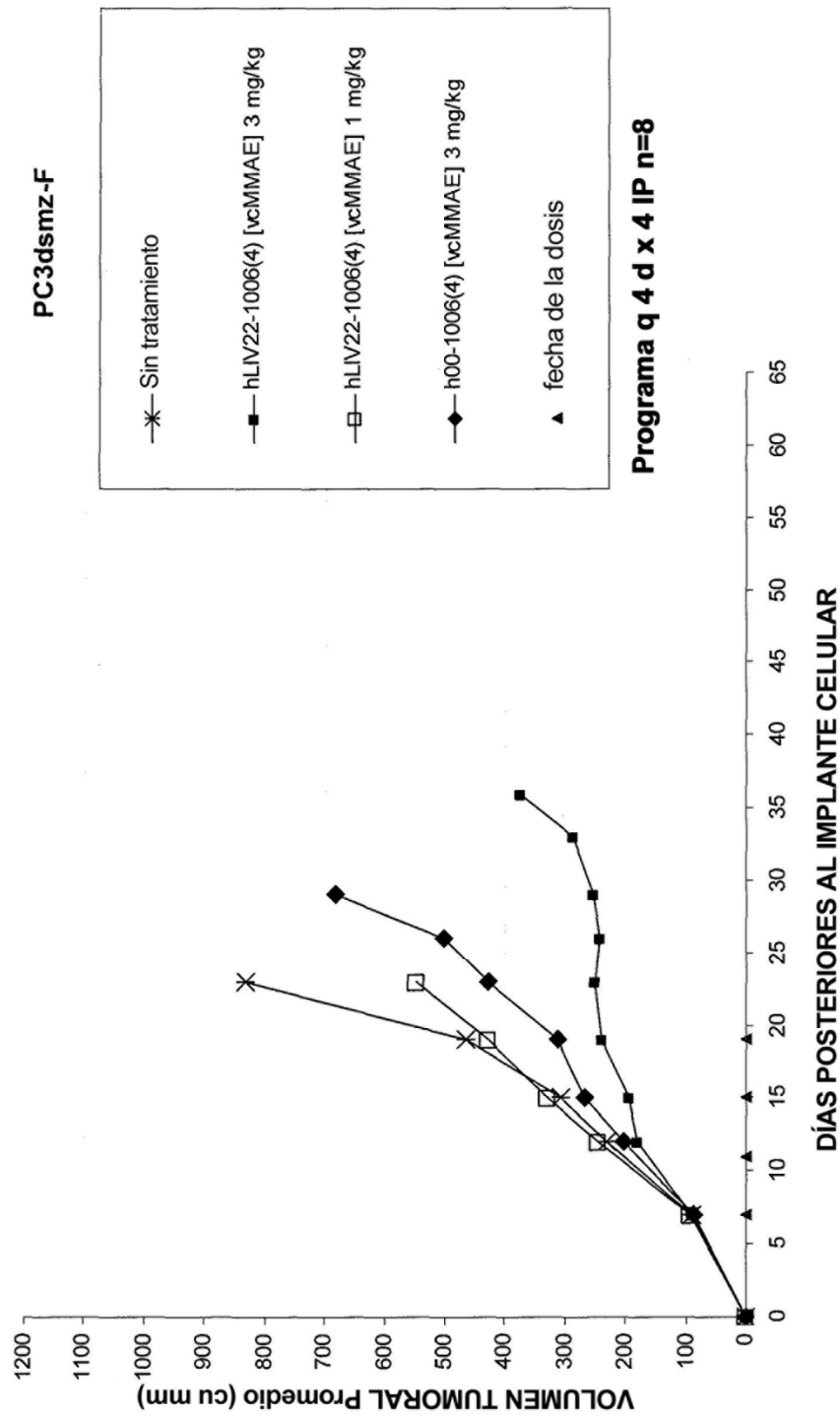


FIGURA 25

Actividad de hLIV22 en tumores carcinoides de mama (NCI) en ratones desnudos

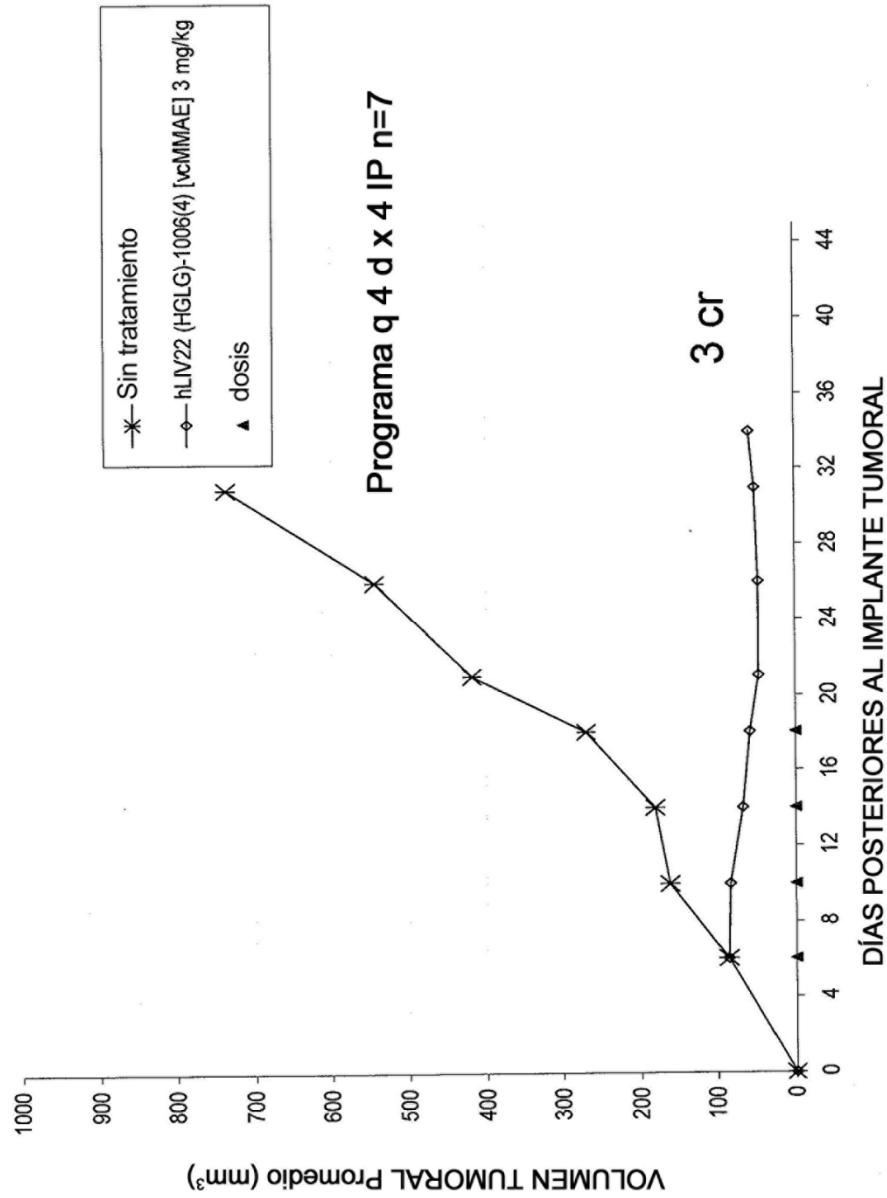


FIGURA 26

Estudio terminado debido a la toxicidad de estrógenos

Actividad de hLIV22 (HGLG) vcMMAE vs hLIV-14vcE

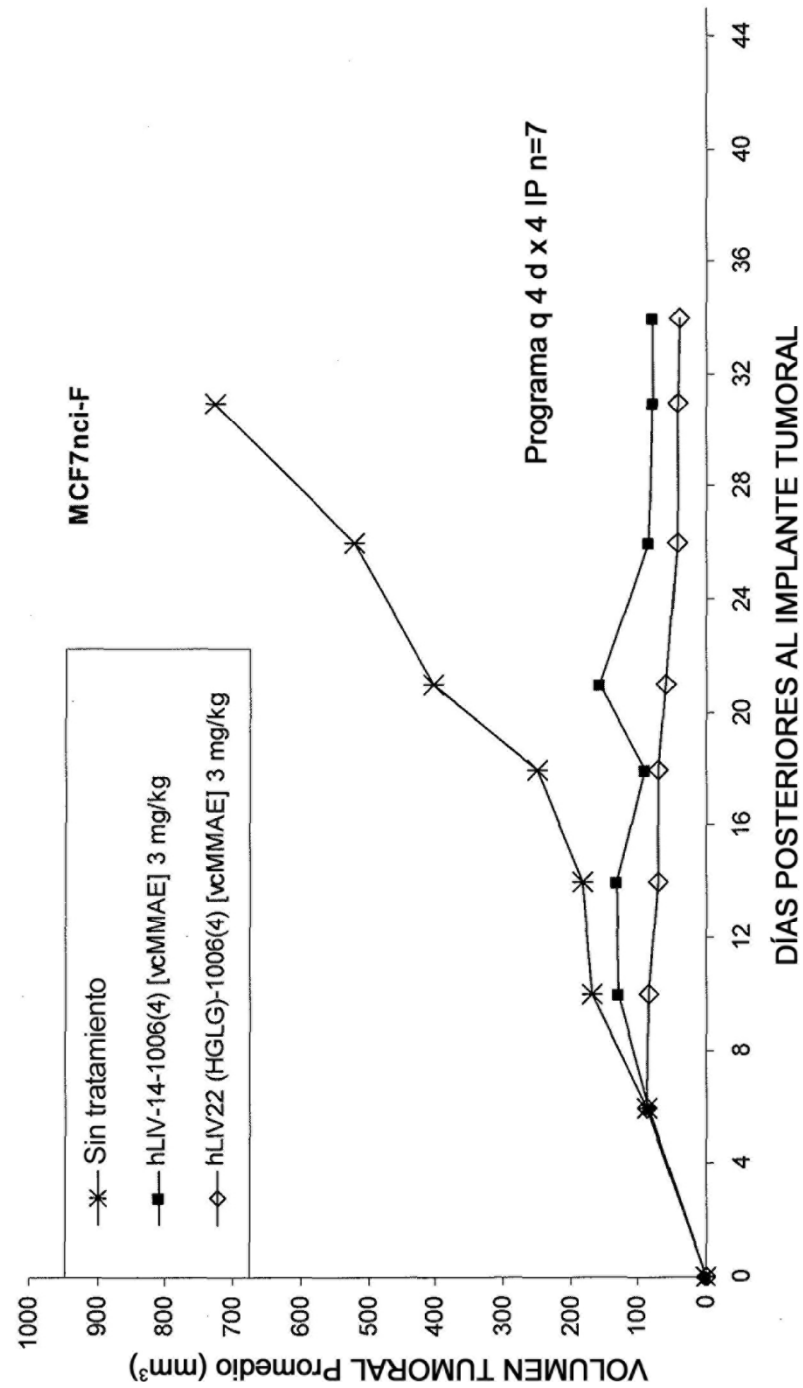


FIGURA 27

Expresión de LIV-1 en biopsias de melanoma

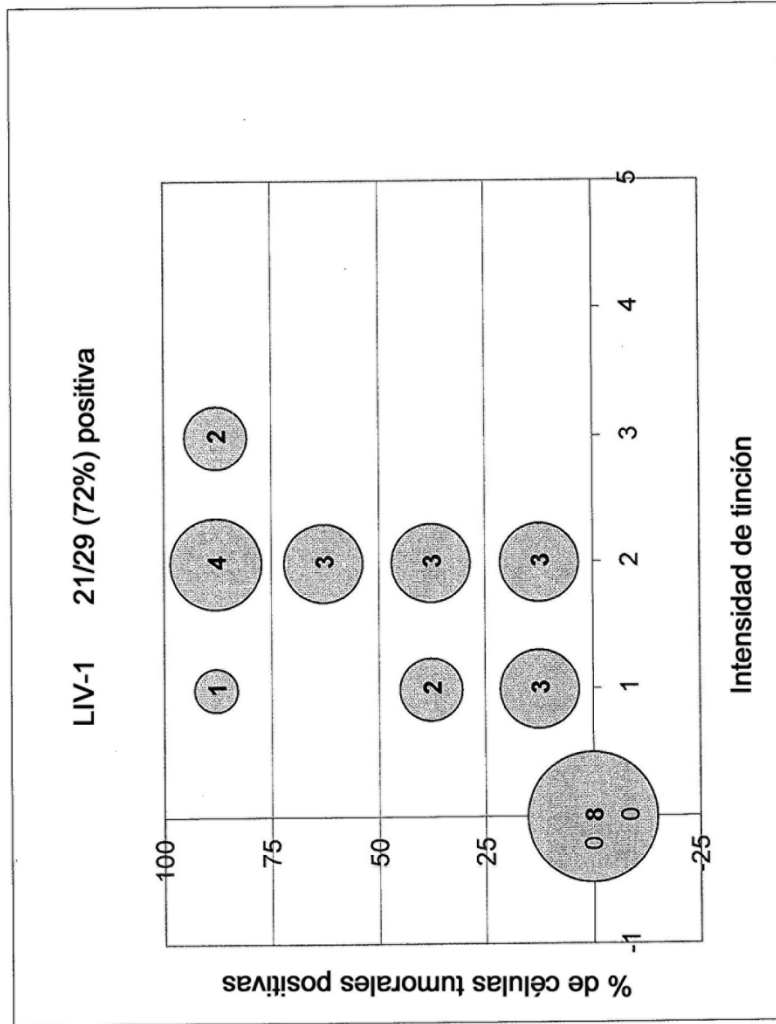


FIGURA 28