

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 881 575**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01) **A61K 31/513** (2006.01)
A61K 38/15 (2006.01) **A61K 31/7048** (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01) **A61K 33/24** (2009.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 47/68** (2007.01)
A61K 39/00 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/277 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2015 PCT/EP2015/072279**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16050702**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2015 E 15770889 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021 EP 3200822**

(54) Título: **Moléculas de unión, especialmente anticuerpos, que se unen a L1CAM (CD171)**

(30) Prioridad:

30.09.2014 EP 14003383

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

29.11.2021

(73) Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGZENTRUM,
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS /
UNIVERSITÄT HEIDELBERG (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

(72) Inventor/es:

**ALTEVOGT, PETER;
LÜTTGAU, SANDRA;
MOLDENHAUER, GERHARD y
HAZIN, JOHN**

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 881 575 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

Moléculas de unión, especialmente anticuerpos, que se unen a L1CAM (CD171)

- 5 La presente invención se refiere a una molécula de unión que se une a L1 como se especifica en las reivindicaciones, ácidos nucleicos que codifican las moléculas de unión, usos de los mismos y composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión.
- 10 Los anticuerpos monoclonales (mAb) han surgido como un pilar nuevo e importante para la terapia contra el cáncer [1]. Durante las dos últimas décadas, la biología molecular ha proporcionado medios para crear anticuerpos químéricos, humanizados o completamente humanos para el tratamiento de las principales enfermedades malignas [2]. Hasta la fecha, muchos anticuerpos y conjugados de anticuerpos están aprobados como terapias contra el cáncer para su comercialización en Europa y Estados Unidos [3, 4]. Comprenden anticuerpos sin modificar, conjugados anticuerpo-fármaco, así como también conjugados con radionúclidos y un anticuerpo biespecífico [5].
- 15 Sin embargo, es bastante conocido que los mAb para un antígeno cancerígeno dado pueden diferir en su capacidad para dirigirse a la célula cancerígena.

En un trabajo reciente hemos demostrado que L1CAM (también llamado L1) puede ser una excelente molécula diana para cánceres humanos. L1CAM se sobreexpresa en muchos cánceres humanos, confiere mal pronóstico y aumenta la motilidad, la invasión y la metástasis celular. Los resultados de los modelos de xenoinjerto [6] y de ratón transgénico L1CAM humano [7] han sugerido que el mAb contra L1CAM L1-9.3 (también llamado mAb 9.3) podría ser una herramienta prometedora para la terapia contra el cáncer. Este mAb se une al 1. El dominio similar a Ig de la molécula L1CAM tiene buenas funciones de ADCC [6]. Resultados recientes han demostrado que este mAb en su versión IgG2a es muy adecuado para activar el sistema inmunológico y reclutar células efectoras inmunes que conducen a la eliminación de las células cancerígenas [6, 7]. Por tanto, existe una amplia evidencia de que este mAb es particularmente adecuado para los mecanismos efectores dependientes de ADCC que representa un brazo importante de la terapia tumoral dependiente de mAb.

30 El documento WO 2008/151819 [12] divulga el anticuerpo anti-L1 9.3 que se une a un epítopo dentro del primer dominio Ig de L1.

Avances recientes en conjugados de anticuerpo-fármaco requieren que los mAb tengan la característica de internalización rápida. Es bastante conocido que la unión de anticuerpos específicos contra L1CAM conducirá a la internalización de L1CAM seguida de reciclaje o degradación de la molécula diana [8]. La característica de internalización de la molécula L1CAM es en común con muchas otras moléculas de la superficie celular. De hecho, se conoce que la internalización de L1CAM es necesaria para la señalización y regulación de la adhesión celular mediada por L1CAM [9-11].

40 La internalización de L1CAM inducida por anticuerpos se ha informado en varias publicaciones (en su mayoría mediante el uso de anticuerpos policlonales), pero no se han llevado a cabo investigaciones sistemáticas con mAb. Por tanto, actualmente no se conoce si el acoplamiento de diferentes epítopos en la molécula L1CAM dará como resultado diferentes velocidades de internalización. Ahora hemos generado un mAb específico contra L1CAM que se une al FNIII-4-5 y se denomina mAb L1-OV52.24 (o OV52.24). Hicimos la sorprendente observación de que este mAb tiene una velocidad de internalización mucho mejor que el mAb L1-9.3 previamente caracterizado. Hicimos la sorprendente observación adicional de que el mAb L1-OV52.24 tiene una velocidad de internalización mucho mejor que los anticuerpos monoclonales anti-L1CAM 5G3 y UJ127.11, respectivamente. Las propiedades únicas de L1-OV52.24 permitirán una administración mejorada y acelerada de fármacos a las células cancerígenas.

50 Aunque algunas características del anticuerpo L1-OV52.24 de la invención ya se han descrito en parte, c.f. [6; y S. Wolterink (2010; "Therapeutische Antikörper gegen L1CAM: Funktionelle Charakterisierung und präklinische Analyse im Ovarialkarzinom"; XP055226426], el propio anticuerpo o la secuencia de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo de la invención nunca se ha publicado o se ha puesto disponible para el público.

55 Muchos agentes terapéuticamente activos solo son eficaces dentro de una célula. Esto crea un problema en caso de que tal agente terapéuticamente activo no pueda entrar en una célula en una forma sin modificar. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes de unión, tales como anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se internalicen eficientemente en las células tumorales y que, por lo tanto, puedan dirigirse a agentes unidos a un agente de unión en una célula tumoral.

60 Se encontró que el anticuerpo monoclonal L1-OV52.24 exhibe sorprendentemente una internalización rápida y eficiente en células de mamíferos portadoras de L1, según lo determinado tanto por análisis microscópico como por citometría de flujo de imágenes de tales células incubadas con L1-OV52.24 durante 40, 60, 70 o 90 minutos, respectivamente, como se muestra en los ejemplos.

- Por lo tanto, tales anticuerpos monoclonales u otras moléculas de unión, tales como los anticuerpos, que se unen a L1 y que se unen al mismo epítopo de L1 reconocido por L1-OV52.24 son sorprendentemente ventajosos en el campo de la investigación biotecnológica, el diagnóstico o la terapia. En particular, un agente activo puede estar ligado a una molécula de unión de la invención, que es absorbida por la célula mediante internalización. Luego, tal agente activo puede ejercer el efecto deseado en la célula, tal como un efecto citotóxico o citostático.
- En una realización, la presente invención se refiere a una molécula de unión que se une a L1, que es capaz de unirse al mismo epítopo de L1 reconocido por un anticuerpo monoclonal, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal comprende, preferentemente, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 1 o en la que la cadena ligera está codificada por la SEQ ID No: 3, y en la que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal comprende, preferentemente, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 2 o en la que la cadena pesada está codificada por la SEQ ID No: 4, y en la que el epítopo está dentro del dominio de fibronectina III 4-5 (FN III 4-5) de L1.
- La SEQ ID No: 1 se refiere al dominio VJ, es decir, la parte variable, de la cadena ligera de L1-OV52.24. El dominio constante de la cadena ligera se conoce en la técnica y su secuencia de ADNc murina se representa más abajo.
- La SEQ ID No: 2 se refiere al dominio VDJ, es decir, la parte variable de la cadena pesada de L1-OV52.24. El dominio constante de la cadena pesada se conoce en la técnica y su secuencia de ADNc murina se representa más abajo.
- L1, también conocida como L1CAM, es una proteína transmembrana; es una molécula de adhesión celular neuronal, miembro de la familia de proteínas L1, de 200-220 kDa, e involucrada en la guía de axones y la migración celular con una fuerte implicación en cánceres resistentes al tratamiento. L1 de acuerdo con la presente invención se entiende preferentemente como proteína L1 de mamífero, con mayor preferencia como proteína L1 humana o de ratón. La entrada de Genbank para la proteína L1 humana es NP_000416 y la entrada de Genbank para la proteína L1 murina es NP_032504. L1CAM también se ha designado como CD171.
- Un epítopo es la parte de un antígeno que es reconocido por anticuerpos o moléculas de unión relacionadas. Por ejemplo, el epítopo es la pieza específica del antígeno al que se une un anticuerpo. Los epítopos pueden ser epítopos conformacionales o epítopos lineales. Un epítopo conformacional se compone de secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del antígeno. Estos epítopos interactúan con el paratopo en base a las características de la superficie 3-D y la forma o estructura terciaria del antígeno. Se desconoce la proporción de epítopos que son conformacionales.
- En los Ejemplos se demostró que L1-OV52.24 se une y reconoce un epítopo dentro del dominio III 4-5 de L1. Los procedimientos para determinar un epítopo unido y reconocido por una molécula de unión se describen en la técnica anterior (Wolterink y otros, Cancer Res. (2010), 70: 2504-2515.) y en los Ejemplos. Como se muestra en los Ejemplos, un epítopo reconocido se determina preferentemente mediante la construcción de una serie de proteínas L1-Fc que llevan dominios de Ig distintos. Para el mapeo fino de acuerdo con los Ejemplos, pueden usarse fragmentos L1 etiquetados con V5 recombinantes, por ejemplo, como se describe en Gouveia y otros. (Protein Expr. Purif. (2007) 52: 182-193). Las proteínas recombinantes pueden usarse en ELISA o en análisis de transferencia Western para mapeo de epítopos. Los mAb L1-OV52.24 reaccionaron con el dominio FN III 4-5 de L1. En general, los procedimientos para determinar el epítopo de un anticuerpo dado se conocen en la técnica e incluyen la preparación de péptidos lineales sintéticos de una región de interés dada y la prueba subsecuente de si el anticuerpo se une a dichos péptidos (ver Epitope Mapping, A practical approach, Oxford University Press 2001, Editors: Olyn Westwood and Frank Hay). Alternativamente, pueden producirse diferentes proteínas recombinantes que cubren la región de interés y puede probarse la unión del anticuerpo (Oleszewski, M., Gutwein, P., von der Lieth, W., Rauch, U., Altevogt, P.; Characterization of the L1-neurocan binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. J.Biol.Chem. 275: 34478-34485 (2000)).
- En una realización adicional, la presente invención se refiere a una molécula de unión que compite con un anticuerpo monoclonal para unirse a L1, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal comprende, preferentemente, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 1 o en la que la cadena ligera está codificada por la SEQ ID No: 3, y en la que la cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal comprende, preferentemente, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 2 o en la que la cadena pesada está codificada por la SEQ ID No: 4, y en la que el epítopo está dentro del dominio de fibronectina III 4-5 (FN III 4-5) de L1.
- La competencia puede determinarse mediante ensayos conocidos por un experto, tales como ensayos de unión por competencia.
- La secuencia de proteínas de la cadena ligera (dominio VJ, sin dominio constante; es decir, la parte variable) de L1-OV52.24 es la siguiente:

1 DIVMTQSQKF MSTSVGDRV~~S~~ VTCKASQNVG TNVAWYQQKP GHSPKALIYS

5 51 TSYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTIRNVQS EDLAEYFCQQ YNTYPYTFGG

101 GTKLEIK (**SEQ ID No: 1**)

10 Las secuencias de las CDR de la cadena ligera (dominio VJ) de L1-OV52.24 de acuerdo con Kabat son las siguientes:

CDR-L1 (o LCDR1): KASQNVGTNVA (SEQ ID No: 5)

15 CDR-L2 (o LCDR2): STSYRYS (SEQ ID No: 6)

CDR-L3 (o LCDR3): QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7)

20 La secuencia de proteínas de la cadena pesada (dominio VDJ, sin dominio constante; es decir, la parte variable) de L1-OV52.24 es la siguiente:

1 EVQLQQSGAE LVRPGALVKL SCKASGFNIK DYYMQWVKQR PEQGLEWIGW

25 51 IDPENGKTVF DPKFRGKASI SADTSSNTAY LQLSSLTSED TAVYYCARWN

101 PLAFWGQGTL VTVSS (**SEQ ID No: 2**)

30 Las secuencias de las CDR de acuerdo con Kabat se muestran subrayadas.

Las secuencias de las CDR de la cadena pesada (dominio VDJ) de L1-OV52.24 de acuerdo con Kabat son las siguientes:

35 CDR-H1 (o HCDR1): FNIKDYYMQ (SEQ ID No: 8)

CDR-H2 (o HCDR2): WIDPENGKTVFDPKFRG (SEQ ID No: 9)

40 CDR-H3 (o HCDR3): WNPLAF (SEQ ID No: 10)

La secuencia de ADNc de los genes de inmunoglobulina del anticuerpo monoclonal L1-OV52.24 es la siguiente:
Código: *5'UTR (parcial, es decir, siempre que esté secuenciado), Líder, IGKV/IGKJ o IGHV/IGHD/IGHJ, IGKC o IGHC*

45 Cadena pesada

50

55

60

65

5 CTGCCtCATGAATATGcAAACATGAGtCTGTGATTATAAATACAgatATATCCAtA
 CCAAACAACTTATGAgCACTGTTTCTACAGTCACTGAATCTCAAgGTCCTTA
CAATGcAATGCAGCTGGTCATCTTCTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGT
CAATTCAAGGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGAGGCCAGG
 10 GCCCTTAGTCAAGTTGCTCTGCAAAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTAC
 TATATGCAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACACAGGGCTGGAGTGGATTGG
 ATGGATTGATCCTGAGAATGGTAAAACAGTTTGACCCGAAGTTCCGGGG
 CAAGGCCAGTATATCAGCGGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCT
 15 CAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTTACTGTGCTAGATGGAA
 CCCCTTGCTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTGCAGCCAA
 AACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAC
 TAACTCCATGGTGACCTGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTCCTGAGCC
 20 AGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCAGCGGTGTGCACACCTT
 CCCAGCTGCTGGAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGA
 CCCCTCCAGCCCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCACC
 CGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGT
 TGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGCTTCATCTTCC
 25 CCCCAAAGCCAAGGATGTGCTACCATTACTCTGACTCCTAAGGTACGT
 GTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGT
 TTGTTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCCGGGAGGAG
 CAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCATCATGCACCA
 GACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTC
 30 CCTGCCCAATCGAGAAAACCCTCTCCAAAACCAAAAGGCAGACCGAAGGC
 TCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAA
 AGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTCCCTGAAGACATTACTGTG
 GAGTGGCAGTGGATGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCC
 40 CATCATGAACACGAATGGCTTTACTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCA
 GAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTCAACCTGCTCTGTGTTACATGA
 GGGCCTGCACAACCACCAACTGAGAAGAGCCTCTCCACTCTCCTGGTAA
 45 **ATGA (SEQ ID No: 4)**

50 Cadena ligera
 55
 60
 65

5 TTTGATGACTGCTTGCATAGATCCCTAGAGGCCAGCCCAGCTGCCATGAT
 TTATAAACCAAGGTCTTGCACTGAGATCTGAAATACATCAGATCAGCATGGC
 ATCAAGATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTGATACATGTTGCTGTGGTTGTC
TGGTGTGATGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTGATGTCCACA
 10 TCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGG
 TACTAATGTGGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGTCACTCTCCTAAAGCACT
 GATTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGG
 CAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCCGCAATGTGCAGTCTGA
 AGACTTGGCAGAGTACTTCTGTCACTGCAATATAACACCTATCCGTACACGTT
 15 GGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGT
 ATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGT
 CGTGTGCTTCTTGAACAACCTCTACCCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAA
 20 GATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCA
 GGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTACGTTGACCA
 AGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTACCTGTGAGGCCACTCACAAAGA
 25 CATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG (SEQ
 ID No: 3)

En una realización preferente, la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal anti-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Una molécula de unión se entiende como polipéptido, que exhibe una unión específica a la diana indicada. De acuerdo con la presente invención, la diana es la proteína L1. Por lo tanto, las moléculas de unión de la invención se unen específicamente a L1. Preferentemente, la molécula de unión es una molécula que comprende inmunoglobulina, es decir, comprende al menos un dominio Ig o un anticuerpo anti-L1.

Por "unión específica" se entiende que la unión de la molécula de unión a L1 es al menos 50 veces, preferentemente al menos 100 veces más fuerte que la unión a una proteína control como la albúmina, según se determina, por ejemplo, mediante análisis de transferencia Western o ELISA.

El término "anticuerpo anti-L1", como se usa en la presente memoria, significa cualquier polipéptido que tiene similitud estructural con un anticuerpo de origen natural y es capaz de unirse a L1, en el que la especificidad de unión está determinada por las CDR de los polipéptidos. Por tanto, se pretende que "anticuerpo anti-L1" se relacione con una estructura derivada de inmunoglobulina con unión a L1. El fragmento de unión a antígeno se entiende como polipéptido que comprende al menos un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos de unión a antígeno consisten en al menos el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera, dispuestos de tal manera que ambos dominios juntos puedan unirse al antígeno específico.

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoespecíficos que son idénticos porque son producidos por un tipo de célula inmunitaria que son todos clones de una sola célula parental. Los "anticuerpos monoclonales" y la producción de anticuerpos monoclonales pertenecen al estado de la técnica. En general, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento conocido de Winter y Milstein (Winter, G. y Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293-299). Una alternativa para la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, puede identificarse y aislar un anticuerpo monoclonal dirigido contra un polipéptido de la invención mediante el cribado de una biblioteca de inmunoglobulina recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación de fagos de anticuerpos) con el polipéptido de interés. Los kits para generar y cribar bibliotecas de presentación de fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, número de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación de fagos Stratagene SurZAP, número de catálogo 240612). Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente adecuados para su uso en la generación y cribado de la biblioteca de presentación de anticuerpos en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.223.409; el documento WO 92/18619; el documento WO 91/17271; el documento WO 92/20791; el documento WO 92/15679; el documento WO 93/01288; el documento WO 92/01047; el documento WO 92/09690; el documento WO 90/02809; Fuchs y otros, 1991, Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay y otros, 1992, Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81-85; Huse y otros, 1989, Science 246: 1275-1281; Griffiths y otros, 1993, EMBO J. 12: 725-734.

- Los anticuerpos de "longitud completa" o "completos" se refieren a proteínas que comprenden dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro que comprenden: (1) en términos de cadenas pesadas, una región variable y una región constante de cadena pesada que comprenden tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3; y (2) en términos de cadenas ligeras, una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera que comprende un dominio, C_L. Con respecto al término "anticuerpo completo", cualquier anticuerpo significa que tiene una estructura de dominio general típica de un anticuerpo de origen natural (es decir, que comprende una cadena pesada de tres o cuatro dominios constantes y una cadena ligera de un dominio constante así como también los respectivos dominios variables), aunque cada dominio puede comprender modificaciones adicionales, tales como mutaciones, delecciones o inserciones, que no cambian la estructura general del dominio. Por ejemplo, mAb L1-OV52.24 es un anticuerpo de longitud completa.
- Un "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo monoclonal es un fragmento de un anticuerpo monoclonal, que exhibe esencialmente la misma función y especificidad que el anticuerpo monoclonal completo del cual se deriva el fragmento. La digestión proteolítica limitada con papaína escinde el prototipo de Ig en tres fragmentos. Dos fragmentos aminoterminales idénticos, cada uno de los cuales contiene una cadena L entera y aproximadamente la mitad de una cadena H, son los fragmentos de unión al antígeno (Fab). El tercer fragmento, de tamaño similar pero que contiene la mitad carboxilo terminal de ambas cadenas pesadas con su enlace disulfuro entre cadenas, es el fragmento cristalizable (Fc). El Fc contiene carbohidratos, sitios de unión al complemento y de unión a FcR. La digestión limitada de pepsina produce un solo fragmento F(ab')₂ que contiene tanto piezas Fab como la región bisagra, que incluye el enlace H-H disulfuro intercadena. F(ab')₂ es divalente para la unión al antígeno. El enlace disulfuro de F(ab')₂ puede escindirse para obtener Fab'. Además, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera pueden fusionarse para formar un fragmento variable monocatenario (scFv).
- Como la primera generación de anticuerpos de tamaño completo presentó algunos problemas, muchos de los anticuerpos de la segunda generación han comprendido solo fragmentos del anticuerpo. Los dominios variables (Fv) son los fragmentos más pequeños con un dominio de unión a antígeno intacto que consiste en un V_L y un V_H. Dichos fragmentos, con solo los dominios de unión, pueden generarse mediante enfoques enzimáticos o expresión de los fragmentos de genes relevantes, por ejemplo, en células bacterianas y eucariotas. Pueden usarse diferentes enfoques, por ejemplo, el fragmento Fv solo o los fragmentos 'Fab' que comprenden uno de los brazos superiores de la "Y" que incluye el Fv más los primeros dominios constantes. Estos fragmentos usualmente se estabilizan mediante la introducción de un enlace polipeptídico entre las dos cadenas, lo que da como resultado la producción de un Fv monocatenario (scFv). Alternativamente, pueden usarse fragmentos Fv unidos por disulfuro (dsFv). Los dominios de unión de los fragmentos pueden combinarse con cualquier dominio constante con el fin de producir anticuerpos de longitud completa o pueden fusionarse con otras proteínas y polipéptidos.
- Un fragmento de anticuerpo recombinante es el fragmento Fv monocatenario (scFv). En general, tiene una alta afinidad por su antígeno y puede expresarse en una variedad de hospederos. Estas y otras propiedades hacen que los fragmentos scFv no solo sean aplicables en la medicina, sino que también tengan potencial para aplicaciones biotecnológicas. Como se detalló anteriormente, en el fragmento scFv los dominios V_H y V_L se unen con un enlazador peptídico hidrófilo y flexible, que mejora la expresión y la eficiencia de plegado. Usualmente, se usan enlazadores de aproximadamente 15 aminoácidos, de los cuales el enlazador (Gly₄Ser)₃ se ha usado con mayor frecuencia. Las moléculas de scFv podrían fácilmente degradarse proteolíticamente, en función del enlazador usado. Con el desarrollo de técnicas de ingeniería genética, estas limitaciones podrían superarse prácticamente mediante investigaciones centradas en la mejora de la función y la estabilidad. Un ejemplo es la generación de fragmentos Fv estabilizados por disulfuro (o enlazados por disulfuro) donde el dímero V_H-V_L se estabiliza mediante un enlace disulfuro intercadena. Las cisteínas se introducen en la interfaz entre los dominios V_L y V_H, lo que forma un puente disulfuro, que mantiene unidos los dos dominios.
- La disociación de scFv da como resultado scFv monoméricos, que pueden formar complejos en dímeros (diacuerpos), trímeros (triacuerpos) o agregados más grandes como TandAb y Flexicuerpos.
- Los anticuerpos con dos dominios de unión pueden crearse mediante la unión de dos scFv con un enlace polipeptídico simple (scFv)2 o mediante la dimerización de dos monómeros (diacuerpos). Los diseños más simples son diacuerpos que tienen dos dominios de unión a antígeno funcionales que pueden ser iguales, similares (diacuerpos bivalentes) o tener especificidad por antígenos distintos (diacuerpos biespecíficos).
- También, se han desarrollado formatos de anticuerpos que comprenden cuatro dominios variables de cadenas pesadas y cuatro dominios variables de cadenas ligeras. Ejemplos de estos incluyen anticuerpos biespecíficos tetravalentes (TandAb y Flexicuerpos, Affimed Therapeutics AG, Heidelberg, Alemania). Contrario a un diacuerpo biespecífico, un TandAb biespecífico es un homodímero que consiste en un solo polipéptido. Debido a las dos cadenas diferentes, un diacuerpo puede construir tres dímeros diferentes, de los cuales solo uno es funcional. Por lo tanto, es más sencillo y económico producir y purificar este producto homogéneo. Además, el TandAb generalmente muestra mejores propiedades de unión (posee el doble de sitios de unión) y mayor estabilidad *in vivo*. Los flexicuerpos son una combinación de scFv con un motivo multimérico de diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente con un alto grado de flexibilidad para unir dos moléculas que están bastante distantes entre sí

en la superficie celular. Si están presentes más de dos dominios de unión a antígenos funcionales y si estos tienen especificidad por antígenos distintos, el anticuerpo es multiespecífico.

- En resumen, las inmunoglobulinas específicas, en las que se pueden insertar secuencias divulgadas en particular o, como alternativa, formar parte esencial de ellas, incluyen las siguientes moléculas de unión que forman realizaciones particulares de la presente invención: un Fab (fragmento monovalente con dominios variable ligero (V_L), variable pesado (V_H), constante ligero (C_L) y constante pesado 1 (C_{H1})), un F(ab')2 (fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro o alternativo en la región bisagra), un Fv (dominios V_L y V_H), un scFv (un Fv monocatenario donde V_L y V_H están unidos por un enlazador, por ejemplo, un enlazador peptídico), una molécula de anticuerpo biespecífico (una molécula de anticuerpo que comprende un polipéptido como se divulga en la presente memoria unido a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente a la del anticuerpo, que incluye, sin limitación, otro péptido o proteína tal como un anticuerpo o ligando de receptor), un dímero Fv monocatenario biespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo (un scFv unido a un C_{H3}).
- Determinadas moléculas de unión o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos monoclonales que incluyen Fv, scFv, moléculas de diacuerpo o anticuerpos de dominio (Domantis) pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro para alinear los dominios VH y VL. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante el uso de tecnologías convencionales, cuyos procedimientos específicos incluyen la producción química, o de hibridomas híbridos, y otras tecnologías, que incluye la tecnología BiTE™ (moléculas que poseen regiones de unión a antígenos de diferente especificidad con un enlazador peptídico) e ingeniería de perillas en agujeros.
- En consecuencia, la molécula de unión o el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal puede ser un Fab, un Fab', un F(ab')2, un Fv, un Fv unido por disulfuro, un scFv, un scFv₂, un anticuerpo bivalente, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un minicuerpo.
- En otra realización preferente, la molécula de unión es un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que al menos una región de una inmunoglobulina de una especie se fusiona con otra región de una inmunoglobulina de otra especie mediante ingeniería genética con el fin de reducir su inmunogenicidad. Por ejemplo, las regiones V_L y V_H murinas pueden fusionarse con la parte restante de una inmunoglobulina humana. Un tipo particular de anticuerpos quiméricos son los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados se producen mediante la fusión del ADN que codifica las CDR de un anticuerpo no humano con el ADN que produce los anticuerpos humanos. La construcción de ADN resultante puede usarse luego para expresar y producir anticuerpos que usualmente no son tan inmunogénicos como el anticuerpo parenteral no humano o como un anticuerpo quimérico, ya que simplemente las CDR no son humanas. Además, el anticuerpo puede ser humano.
- Se prefiere el uso de un anticuerpo humano, o al menos humanizado, para aplicaciones en humanos, por ejemplo, para la prevención, el tratamiento o el diagnóstico in vivo.
- En una realización preferente de la presente invención, la molécula de unión, en particular el anticuerpo monoclonal, comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana.
- Como se detalló anteriormente en el contexto de la molécula de unión, preferentemente el anticuerpo monoclonal de la presente invención, cada cadena pesada de un anticuerpo de origen natural tiene dos regiones, la región constante y la región variable. Hay cinco tipos de cadena pesada de inmunoglobulinas de mamíferos: γ , δ , α , μ y ϵ , que definen clases de inmunoglobulinas IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente.
- Hay cuatro subclases de IgG (IgG1, 2, 3 y 4) en humanos, nombradas en orden de su abundancia en suero (IgG1 es la más abundante). Aunque hay aproximadamente un 95 % de similitud entre sus regiones Fc de las subclases de IgG, la estructura de las regiones de bisagra es relativamente diferente. Esta región, entre los brazos de Fab (fragmento de unión al antígeno) y los dos dominios carboxi-terminales C_{H2} y C_{H3} de ambas cadenas pesadas, determina la flexibilidad de la molécula. El segmento superior de la bisagra (hacia el amino-terminal) permite la variabilidad del ángulo entre los brazos Fab (flexibilidad Fab-Fab) así como también la flexibilidad rotacional de cada Fab individual. La flexibilidad de la región inferior de bisagra (hacia el extremo carboxi-terminal) determina directamente la posición de los brazos Fab con respecto a la región Fc (flexibilidad Fab-Fc). La flexibilidad Fab-Fab y Fab-Fc dependiente de la bisagra puede ser importante para desencadenar funciones efectoras adicionales como la activación del complemento y la unión al receptor de Fc. En consecuencia, la estructura de las regiones bisagra da a cada una de las cuatro clases de IgG su perfil biológico único.
- La longitud y flexibilidad de la región bisagra varía entre las subclases de IgG. La región bisagra de IgG1 abarca los aminoácidos 216-231 y ya que es libremente flexible, los fragmentos Fab pueden rotar alrededor de sus ejes de simetría y moverse dentro de una esfera centrada en el primero de dos puentes disulfuro entre cadenas pesadas.

IgG2 tiene una bisagra más corta que IgG1, con 12 residuos de aminoácidos y cuatro puentes disulfuro. La región bisagra de IgG2 carece de un residuo de glicina, es relativamente corta y contiene una doble hélice rígida de poliprolina, estabilizada por puentes disulfuro extra entre cadenas pesadas. Estas propiedades restringen la flexibilidad de la molécula de IgG2. IgG3 se diferencia de las otras subclases por su región bisagra extendida única (aproximadamente cuatro veces más larga que la bisagra de IgG1), que contiene 62 aminoácidos (que incluye 21 prolinas y 11 cisteínas), que forma una doble hélice de poliprolina inflexible. En IgG3, los fragmentos Fab están relativamente lejos del fragmento Fc, lo que le da a la molécula una mayor flexibilidad. La bisagra alargada en IgG3 también es responsable de su mayor peso molecular en comparación con las otras subclases. La región bisagra de IgG4 es más corta que la de IgG1 y su flexibilidad es intermedia entre la de IgG1 e IgG2.

Por lo tanto, en una realización aún más preferente, la molécula de unión se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monocatenario, preferentemente seleccionado de un scFv y un multímero de scFv, como un diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo, un fragmento de anticuerpo, preferentemente un Fab, un TandAb, un flexicuerpo y un anticuerpo biespecífico.

En una realización aún más preferente, la molécula de unión es un anticuerpo químérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Como puede tomarse de los ejemplos, el epítopo del anticuerpo L1-OV52.24 está dentro del dominio de fibronectina III 4-5 de L1. Por lo tanto, también el epítopo de las moléculas de unión, en particular los anticuerpos monoclonales o sus fragmentos de unión a antígeno de la invención, está dentro del dominio de fibronectina III 4-5 de L1.

Por lo tanto, el epítopo está dentro del dominio de fibronectina III 4-5 (FN III 4-5) de L1.

L1-OV52.24 tiene las secuencias de CDR siguientes: KASQNVGTNVA (LCDR1; SEQ ID No: 5), STSYRYS (LCDR2; SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (LCDR3; SEQ ID No: 7), FNIKDYMMQ (HCDR1; SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (HCDR2; SEQ ID No: 9) y WNPLAF (HCDR3; SEQ ID No: 10).

Las secuencias mencionadas anteriormente muestran las CDR del anticuerpo monoclonal L1-OV52.24 determinadas de acuerdo con el procedimiento de Kabat, que es generalmente conocido en la técnica.

Por lo tanto, se divulga que la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal anti-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que al menos una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo

a) tiene una de las secuencias seleccionadas de KASQNVGTNVA (SEQ ID No: 5), STSYRYS (SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7), FNIKDYMMQ (SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (SEQ ID No: 9), and WNPLAF (SEQ ID No: 10), o

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

Tal anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a anticuerpo del mismo puede producirse, por ejemplo, mediante el injerto de CDR o mediante la producción recombinante del anticuerpo. Tales procedimientos se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Queen, patente de Estados Unidos núm. 5,585,089 y Winter, U.S: 5,225,539, Cabilly U.S. 4,816,567).

Además, las secuencias de las CDR pueden alterarse, preferentemente mediante intercambios que conduzcan a un intercambio de aminoácidos conservativo.

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

Se divulga que la molécula de unión de la invención se caracteriza porque la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal anti-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7) y WNPLAF (SEQ ID No: 10), en las que opcionalmente están presentes uno o más intercambios de aminoácidos conservativos.

La SEQ ID No: 7 representa la secuencia LCDR3 y la SEQ ID No: 10 representa la secuencia HCDR3 de L1-OV52.24. Se conoce que LCDR3 y HCDR3 son importantes para las propiedades de unión de un anticuerpo.

En una realización más preferente, la molécula de unión de la invención se caracteriza porque la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal anti-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y en el que el anticuerpo monoclonal anti-L1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las regiones determinantes de

complementariedad (CDR) KASQNVGTNVA (SEQ ID No: 5), STSYRYS (SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (SEQ ID No: 9) y WNPLAF (SEQ ID No: 10).

En esta realización preferente, no están presentes intercambios de aminoácidos conservativos.

5 En una realización incluso más preferente, la molécula de unión de la invención se caracteriza porque la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal anti-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y en el que el anticuerpo monoclonal anti-L1, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) KASQNVGTNVA (LCDR1; SEQ ID No: 5), STSYRYS (LCDR2; SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (LCDR3; SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (HCDR1; SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (HCDR2; SEQ ID No: 9) y WNPLAF (HCDR3; SEQ ID No: 10).

En esta realización preferente, no están presentes intercambios de aminoácidos conservativos.

10 15 En una realización preferente adicional, el anticuerpo monoclonal anti-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo IgG1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Se divulga que la molécula de unión comprende

20 25 a) al menos una de las secuencias seleccionadas de KASQNVGTNVA (SEQ ID No: 5), STSYRYS (SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (SEQ ID No: 9) y WNPLAF (SEQ ID No: 10), o

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

Se divulga que la molécula de unión comprende las secuencias QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7) y WNPLAF (SEQ ID No: 10), en las que opcionalmente están presentes uno o más intercambios de aminoácidos conservativos.

30 35 En una realización incluso más preferente, la molécula de unión de la invención comprende las secuencias KASQNVGTNVA (SEQ ID No: 5), STSYRYS (SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (SEQ ID No: 9) y WNPLAF (SEQ ID No: 10).

En esta realización preferente, no están presentes intercambios de aminoácidos conservativos.

40 45 En una realización preferente, la molécula de unión de la invención es un anticuerpo monoclonal anti-L1 que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) KASQNVGTNVA (SEQ ID No: 5), STSYRYS (SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (SEQ ID No: 9) y WNPLAF (SEQ ID No: 10), o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

50 55 En una realización preferente, la molécula de unión de la invención es un anticuerpo monoclonal anti-L1 que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) KASQNVGTNVA (LCDR1; SEQ ID No: 5), STSYRYS (LCDR2; SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (LCDR3; SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (HCDR1; SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (HCDR2; SEQ ID No: 9) y WNPLAF (HCDR3; SEQ ID No: 10), o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Se prefiere que una molécula de unión de la invención exhiba una fuerte afinidad por L1. Se encontró que L1-OV52.24 exhibe una afinidad de KD (M) = $2,41 \times 10^{-9}$ para L1.

60 65 Por lo tanto, en otra realización preferente adicional, la molécula de unión de la invención, preferentemente el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10^{-9} M, preferentemente de al menos 10^{-10} M o 10^{-11} M.

Sorprendentemente, se encontró que L1-OV52.24 se internaliza eficientemente en las células SKOV3ip después de 40, 60, 70 o 90 minutos de incubación, como se muestra en los Ejemplos y las Figuras, mientras que el anticuerpo monoclonal anti-L1 comparativo 9.3 se internaliza solo en un pequeño grado. La internalización puede determinarse mediante el uso de una molécula de unión que está unida a un compuesto de diagnóstico adecuado, tal como un compuesto fluorescente. En los ejemplos, se usó Alexa488 como colorante fluorescente. La cuantificación de la internalización puede realizarse tanto mediante análisis y recuento microscópico o mediante citometría de flujo de

- imágenes, como se describe en los ejemplos. Con ambos procedimientos, se encontró que L1-OV52.24 se internalizó en cada punto de tiempo medido al menos 4 veces más eficientemente que el anticuerpo 9.3. Además, sorprendentemente se encontró que L1-OV52.24 se internalizó de manera más eficiente que los anticuerpos monoclonales anti-L1CAM 5G3 y UJ127.11 disponibles comercialmente en los puntos de tiempo medidos 60' y 90' (Figura 6). Las propiedades de internalización superiores y sorprendentes de L1-OV52.24 determinadas en los Ejemplos se resumen en la Figura 7. Sorprendentemente se encontró que la internalización de L1-OV52.24 a 90' es significativamente mayor que la internalización de cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-L1CAM 9.3, 5G3 y UJ127.11 de la técnica anterior, con un valor de $p \leq 0,01$, respectivamente. Por lo tanto, L1-OV52.24 o sus fragmentos de unión a antígeno o moléculas de unión que reconocen el mismo epítopo que L1-OV52.24, son particularmente adecuados para la administración de un agente terapéuticamente activo (administración de fármacos) o para la administración de un compuesto de diagnóstico, por ejemplo, con fines de formación de imágenes.
- En otra realización aún más preferente, la molécula de unión de la invención se internaliza en una célula de mamífero que expresa L1, preferentemente en la que la célula es una célula tumoral de mamífero que expresa L1, con mayor preferencia una célula SKOV3ip.
- En una realización preferente, la internalización por la célula de mamífero que expresa L1, preferentemente en la que la célula es una célula SKOV3ip, se determina mediante análisis y cuantificación microscópica, o mediante citometría de flujo de imágenes. Los procedimientos se realizan preferentemente como se describe en los Ejemplos. En una realización preferente adicional, la internalización es al menos 2 veces, preferentemente al menos 4 veces, con mayor preferencia al menos 7 veces, con la máxima preferencia al menos 10 veces mayor que la internalización del anticuerpo monoclonal 9.3 como se describió en el documento WO 2008/151819 después de 40, 60, 70 o 90 minutos de incubación. En una realización aún más preferente, la internalización es al menos 2 veces, preferentemente al menos 4 veces mayor que la internalización del anticuerpo monoclonal 5G3 después de 60 o 90 minutos de incubación. En una realización aún más preferente, la internalización es al menos 2 veces, preferentemente al menos 4 veces mayor que la internalización del anticuerpo monoclonal UJ127.11 después de 60 o 90 minutos de incubación.
- En una realización incluso más preferente, la molécula de unión de la invención es un anticuerpo monoclonal, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal comprende, preferentemente, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 1 o en la que la cadena ligera está codificada por la SEQ ID No: 3, y en la que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal comprende, preferentemente, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 2 o en la que la cadena pesada está codificada por la SEQ ID No: 4 o en un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- En una realización preferente, la parte variable de la cadena ligera de L1-OV52.24 comprende, preferentemente la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 1 y en la parte variable de la cadena pesada de dicho L1-OV52.24 comprende, preferentemente, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 2.
- Las secuencias SEQ ID No: 1 y 2 se refieren al dominio VJ; es decir, la parte variable de la cadena ligera de L1-OV52.24 y el dominio VDJ; es decir, la parte variable de la cadena pesada de L1-OV52.24, respectivamente, como se muestra más arriba.
- Por lo tanto, la invención se refiere en una realización al anticuerpo monoclonal L1-OV52.24 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo monoclonal L1-OV52.24 se divulga en la presente memoria mediante las secuencias de las respectivas partes variables de sus cadenas pesada y ligera (SEQ ID No: 2 y SEQ ID No: 1, respectivamente) y/o los ADNc que codifican las cadenas pesada y ligera (SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4, respectivamente).
- En una realización particularmente preferente, la molécula de unión de la invención se une a una sustancia terapéuticamente activa, lo que permite la internalización de la sustancia terapéuticamente activa.
- Una sustancia terapéuticamente activa de acuerdo con la invención se entiende como un compuesto que tiene un efecto terapéutico o preventivo en un animal, preferentemente un mamífero, incluso con mayor preferencia un humano.
- En una realización más preferente, la sustancia terapéuticamente activa tiene un efecto terapéutico o preventivo en un animal, útil para tratar o prevenir una enfermedad tumoral y/o una enfermedad asociada con la expresión de L1.
- En una realización preferente, la sustancia terapéuticamente activa es un compuesto útil en quimioterapia, es decir, un compuesto quimioterapéutico. En una realización preferente, la sustancia terapéuticamente activa es un compuesto citotóxico o citostático.
- Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a una molécula de unión de la invención unida a una sustancia terapéuticamente activa,

- preferentemente a un compuesto quimioterapéutico, preferentemente seleccionado de un agente alquilante, un antibiótico antineoplásico, un antimetabolito y un derivado de fuente natural, un compuesto citotóxico, un compuesto citostático, una citocina, una nanopartícula o un radionúclido.
- Las citocinas adecuadas son, por ejemplo, TNFalfa, IL-2 e IL-12.
- Los compuestos quimioterapéuticos adecuados se conocen en la técnica. Estos compuestos se clasifican en varias categorías diferentes, que incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes, antibióticos antineoplásicos, antimetabolitos y derivados de fuentes naturales.
- Los ejemplos de agentes alquilantes que pueden usarse en la invención incluyen busulfano, caroplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida (es decir, citoxano), dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecolaretamina, melfalán, procarbazina, estreptozocina y tiotepa.
- Los ejemplos de antibióticos antineoplásicos incluyen bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, idarrubicina, mitomicina (por ejemplo, mitomicina C), mitoxantrona, pentostatina y plicamicina.
- Los ejemplos de antimetabolitos incluyen fluorodesoxiuridina, cladribina, citarabina, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5FU)), gemcitabina, hidroxiurea, mercaptopericina, metotrexato y tioguanina.
- Los ejemplos de derivados de fuentes naturales incluyen docetaxel, etopósido, irinotecán, taxanos (por ejemplo, paclitaxel), tenipósido, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, prednisona y tamoxifeno.
- Los ejemplos adicionales de agentes quimioterapéuticos que pueden usarse en la invención incluyen asparaginasa y mitotano.
- Además, también puede usarse ceramida C2.
- Se entiende que "unido" de acuerdo con la presente invención abarca tanto el enlace covalente como el no covalente, preferentemente el enlace covalente. En la realización de un enlace covalente, la molécula de unión de la invención puede unirse directamente al agente terapéuticamente activo o al compuesto de diagnóstico o mediante una molécula de enlace adecuada. En la realización más preferente de la presente invención, la molécula de unión se une al agente terapéuticamente activo o al compuesto de diagnóstico mediante un enlazador. Los enlazadores adecuados se conocen en la técnica.
- Por lo tanto, en una realización preferente, la molécula de unión se une covalentemente a una sustancia terapéuticamente activa y/o al compuesto de diagnóstico, opcionalmente mediante un enlazador.
- Los radionucleidos adecuados incluyen $^{67/64}\text{Cu}$, ^{131}I , ^{124}I , o ^{90}Y . Dichos radionúclidos pueden unirse mediante restos formadores de complejos o, en el caso del yodo, directamente mediante enlace covalente a la molécula de unión de la invención. Los restos formadores de complejos se unen preferentemente de forma covalente a la molécula de unión, opcionalmente mediante un enlazador.
- Tales conjugados de anticuerpos se conocen en la técnica (Wu A.M., Senter P.D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature Biotechnol.* 23: 1137-1146, 2005, Pastan I., Hassan R., FitzGerald D.J., Kreitman R.J. Immunotoxin treatment of cancer. *Annu. Rev. Med.* 58: 221-237, 2007, el documento WO 90/12592, el documento WO 2007/030642, el documento WO 2004/067038, el documento WO 2004/003183, el documento US 2005/0074426, el documento WO 94/04189).
- En una realización más preferente, la sustancia terapéuticamente activa es un compuesto quimioterapéutico, o un compuesto citotóxico o un compuesto citostático seleccionado de un agente que daña el ADN, en particular actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino, doxorrubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina, 5-FU, un derivado de fuente natural y un taxano, preferentemente paclitaxel y carboplatino.
- Además, puede ser ventajoso unir las moléculas de unión de la invención a un compuesto de diagnóstico. Un compuesto de diagnóstico es un compuesto que es capaz de producir una señal mediante detección directa o indirecta. En una realización preferente, el compuesto es adecuado para la administración a un animal, tal como un mamífero, con mayor preferencia un humano. En esta realización, la molécula de unión unida puede ser adecuada tanto para su uso *in vitro* como para su uso *in vivo*. En otra realización preferente, el compuesto no es adecuado para la administración a un animal, tal como un mamífero, con mayor preferencia un humano. En esta realización, la

molécula de unión unida puede ser adecuada para su uso *in vitro*. Por tanto, el compuesto de diagnóstico puede detectarse directa o indirectamente. Para la detección directa, los compuestos diagnósticos adecuados para su uso en la presente invención pueden seleccionarse de cualquier grupo marcador detectable conocido, como cromógenos, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo, ésteres de acridinio o dioxetanos), compuestos electroquimioluminiscentes, catalizadores, enzimas, sustratos enzimáticos, colorantes, colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y sus derivados), partículas coloidales metálicas y no metálicas y partículas de látex de polímero orgánico. Otros ejemplos de compuestos diagnósticos son los complejos de metales luminiscentes, como los complejos de rutenio o europio y radioisótopos.

Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, socios de un par de unión de bioafines. Ejemplos de pares de unión adecuados son hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina tales como aminobiota, iminobiota o destiobiota/avidina o estreptavidina, azúcar/lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario y receptor/ligando, por ejemplo, esteroide receptor de hormonas/hormona esteroidea.

Por lo tanto, en una realización adicional, la invención se refiere a una molécula de unión de la invención unida a un compuesto de diagnóstico, preferentemente seleccionado de un radionúclido, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un colorante o una enzima.

Como se muestra en los Ejemplos, el anticuerpo monoclonal L1-OV52.24 se unió con éxito a un compuesto fluorescente o colorante fluorescente, a saber, a un colorante Alexa (Alexa488).

En otra realización, la presente invención se refiere a una célula de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal anti-L1 de la invención.

En otra realización, la presente invención se refiere a un ácido nucleico

- 30 i. que codifica una molécula de unión de acuerdo con la invención, y/o
- ii. que codifica al menos una cadena de una molécula de unión de acuerdo con la invención, y/o
- iii. que comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 3 y/o de acuerdo con la SEQ ID No: 4, y/o
- iv. que comprende la(s) secuencia(s) que codifica(n) al menos las secuencias QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7) y WNPLAF (SEQ ID No: 10).

35 En una realización más preferente, el ácido nucleico de la invención es parte de un vector. Tal vector es preferentemente un vector de expresión en bacterias, tales como *E. coli*, en una célula de levadura, en células de insectos o células de mamíferos. Preferentemente, los ácidos nucleicos de la invención están bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas tales como promotores o potenciadores en el vector, lo que permite de esta manera la expresión en una célula hospedera. Los vectores comprenden preferentemente secuencias que permiten la replicación en una célula hospedera.

40 Preferentemente, la molécula de unión unida a un compuesto de diagnóstico puede usarse con fines de diagnóstico *in vitro* y, de esta manera, se relaciona con una herramienta importante para la investigación biotecnológica. Por ejemplo, las biopsias de pacientes o muestras corporales en general pueden analizarse mediante el uso de las moléculas de unión de la invención. Por lo tanto, una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de una molécula de unión de la invención como un agente de diagnóstico *in vitro* o como un agente biotecnológico *in vitro*. En una realización más preferente, la presente invención se refiere al uso de una molécula de unión de la invención unida a un compuesto de diagnóstico como un agente de diagnóstico *in vitro* o como un agente biotecnológico *in vitro*. En otra realización preferente, la presente invención se refiere al uso de una molécula de unión de la invención unida a una sustancia terapéuticamente activa como un agente biotecnológico *in vitro*.

45 En otra realización adicional, la presente invención se refiere a una molécula de unión de la invención, para su uso como medicamento o agente de diagnóstico.

50 En una realización particularmente preferente, la molécula de unión para su uso como medicamento es una molécula de unión unida a una sustancia terapéuticamente activa, como se describió anteriormente. La molécula de unión entrega la sustancia terapéuticamente activa a una célula tumoral donde la molécula de unión unida a una sustancia terapéuticamente activa puede ejercer su efecto terapéutico.

55 En una realización preferente, la sustancia terapéuticamente activa se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva.

60 En una realización preferente adicional, la molécula de unión para su uso como diagnóstico es una molécula de unión unida a un compuesto de diagnóstico. De esta manera, la formación de imágenes puede realizarse con el paciente, lo que permite el diagnóstico, como el pronóstico o el seguimiento de la terapia con una molécula de unión

de la invención. Por lo tanto, la molécula de unión de la invención unida a un compuesto de diagnóstico es preferentemente un diagnóstico complementario de la molécula de unión unida a una sustancia terapéuticamente activa de la invención.

- 5 Las moléculas de unión de la invención se incluyen preferentemente en una composición farmacéutica.

Es posible que un compuesto sea tanto un compuesto de diagnóstico como una sustancia terapéuticamente activa. Un ejemplo son determinados radionucleidos, como ^{131}I , que puede ser adecuado tanto para la formación de imágenes in vivo como para la terapia de tumores.

10 En general, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión de la invención y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, el término "farmacéuticamente aceptable" significa, aprobado por una agencia regulatoria 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 humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, que incluye aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. El agua es un portador preferente cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. La solución salina y la dextrosa acuosa son portadores preferentes cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa acuosa y glicerol se emplean preferentemente como portadores líquidos para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propilenglicol, agua y etanol. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos o formulaciones de liberación sostenida. La composición puede formularse como un suppositorio, con aglutinantes tradicionales y portadores tales como los triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa o carbonato de magnesio. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma de administración adecuada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

35 Preferentemente, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición farmacéutica también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proporcionan separadamente, o mezclados conjuntamente, en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente como un ámpula o bolsita, que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por infusión, ésta puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, un ámpula de agua estéril para inyección o solución salina puede proporcionarse de manera que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

50 Los agentes terapéuticos de la invención pueden formularse como formas salinas o neutras. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos carboxilo libres, tales como las derivadas de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, las formadas con grupos amina libres, como las derivadas de isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio y férrico.

55 La cantidad de agente terapéutico de la invención, que será efectivo en el tratamiento de un trastorno o afección particular, dependerá de la naturaleza del trastorno o afección y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse, opcionalmente, para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa a emplear en la formulación dependerá además de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para la administración intravenosa son generalmente de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosificación adecuados para la administración intranasal son generalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis efectivas pueden ser extrapoladas a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas de prueba del modelo animal o *in vitro*. En general, los supositorios pueden contener el ingrediente activo en el intervalo de 0,5 % a 10 % en peso; las formulaciones orales contienen preferentemente del 10 % al 95 % de ingrediente activo.

- Se conocen varios sistemas de administración y pueden usarse para administrar un agente terapéutico de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas y microcápsulas: uso de células recombinantes capaces de expresar el agente terapéutico, uso de endocitosis mediada por receptores (por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432); construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un retroviral u otro vector. Los procedimientos de introducción incluyen las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión, por inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal), y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, que incluye la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también puede emplearse, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de atomización.
- Preferentemente, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesita tratamiento. Esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no como una vía de limitación, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un suppositorio, o mediante un implante, dicho implante es de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialísticas o fibras. Preferentemente, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un tumor maligno o tejido neoplásico o pre-neoplásico.
- Preferentemente, el agente terapéutico puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990, Science 249: 1527-1533), más particular en un liposoma catiónico (documento WO 98/40052).
- Preferentemente, el agente terapéutico puede administrarse mediante un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (Langer, anterior). Preferentemente, puede colocarse un sistema de liberación controlada en las proximidades de la diana terapéutica, por tanto, requiere solo una fracción de la dosis sistémica.
- Se divulga un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad tumoral en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión, preferentemente un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención.
- A lo largo de la invención, el término "cantidad efectiva" significa que una molécula o compuesto dado se administra en una cantidad suficiente para obtener un efecto terapéutico deseado. En caso de que, a lo largo de la invención, se administren dos compuestos en una cantidad terapéuticamente efectiva, esto incluye que uno o cada uno de los compuestos se administre en una cantidad subterapéutica, es decir, que la cantidad de cada compuesto por sí solo no sea suficiente para proporcionar un efecto terapéutico, pero que la combinación de los compuestos da como resultado el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, también se incluye en la presente invención que cada uno de los compuestos por sí solo se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva.
- De acuerdo con la invención, el término "tratamiento de la enfermedad tumoral" incluye tanto la destrucción de células tumorales, la reducción de la proliferación de células tumorales (por ejemplo, en al menos un 30 %, al menos un 50 % o al menos un 90 %) así como también la inhibición completa de la proliferación de células tumorales en un paciente que padece una enfermedad tumoral. Además, este término incluye la prevención de una enfermedad tumorigénica, por ejemplo, mediante la destrucción de células que pueden, o están propensas a, convertirse en células tumorales en el futuro, así como la formación de metástasis.
- De acuerdo con la invención, el experto en la técnica comprenderá que la terapia individual que se aplicará dependerá, por ejemplo, de las condiciones físicas del paciente o de la gravedad de la enfermedad y, por lo tanto, deberá ajustarse caso por caso.
- La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión a antígeno del mismo, o la molécula de unión de la invención. Con respecto a dicha composición farmacéutica, también se aplican todas las realizaciones descritas anteriormente.
- En otra realización adicional, la presente invención se refiere a una molécula de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad tumoral, preferentemente en la que la enfermedad tumoral es una enfermedad tumoral epitelial y/o se selecciona del grupo que consiste en astrocitoma, oligodendrogloma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer renal, neuroblastoma, carcinoma escamoso, meduloblastoma, hepatoma, cáncer de colon, mesotelioma y carcinoma epidermoide.

En otra realización adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende una molécula de unión de la invención y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, como se describió anteriormente.

- 5 Se divulga una molécula de unión a L1, en la que la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal anti-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizada porque al menos una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-L1 o fragmento de unión a antígeno del mismo
- 10 a) tiene una de las secuencias seleccionadas de KASQNVGTNVA (SEQ ID No: 5), STSYRYS (SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (SEQ ID No: 9), and WNPLAF (SEQ ID No: 10), o
- 15 b) tiene una secuencia que, en comparación con las secuencias mencionadas en a), tiene al menos un intercambio de aminoácidos conservativo.
- 15 Se divulga una molécula de unión que se une a L1, caracterizada porque la molécula de unión comprende
- 20 a) al menos una de las secuencias seleccionadas de KASQNVGTNVA (SEQ ID No: 5), STSYRYS (SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (SEQ ID No: 9) y WNPLAF (SEQ ID No: 10), o
- b) comprende una secuencia que, en comparación con las secuencias mencionadas en a) tiene al menos un intercambio de aminoácidos conservativo.
- 25 Tal anticuerpo monoclonal o fragmento de unión de anticuerpo del mismo o moléculas de unión pueden producirse, por ejemplo, mediante el injerto de CDR o mediante la producción recombinante del anticuerpo. Tales procedimientos se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Queen, patente de Estados Unidos núm. 5,585,089 y Winter, U.S: 5,225,539, Cabilly U.S. 4,816,567).
- 30 Las realizaciones preferentes de la invención descritas en la presente memoria se aplican a todas las moléculas de unión y anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención.

Referencias

- 35 1. Galluzzi L, Vacchelli E, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, Tartour E, Zucman-Rossi J, Zitvogel L, Kroemer G: Trial Watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012, 1(1):28-37.
2. Presta LG: Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr Opin Immunol* 2008, 20(4):460-470.
- 40 3. Reichert JM: Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 2012, 4(3).
4. Reichert JM: Antibodies to watch in 2014: mid-year update. *MAbs* 2014, 6(4):799-802.
5. Reichert JM: Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs* 2011, 3(1):76-99.
6. Wolterink S, Moldenhauer G, Fogel M, Kiefel H, Pfeifer M, Luttgau S, Gouveia R, Costa J, Endell J, Moebius U y otros: Therapeutic antibodies to human L1CAM: functional characterization and application in a mouse model for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2010, 70(6):2504-2515.
- 45 7. Doberstein K, Harter PN, Haberkorn U, Bretz NP, Arnold B, Carretero R, Moldenhauer G, Mittelbronn M, Altevogt P: Antibody therapy to human L1CAM in a transgenic mouse model blocks local tumor growth but induces EMT. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014.
8. Novak-Hofer I, Amstutz HP, Morgenthaler JJ, Schubiger PA: Internalization and degradation of monoclonal antibody chCE7 by human neuroblastoma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 1994, 57(3):427-432.
- 50 9. Schaefer AW, Kamiguchi H, Wong EV, Beach CM, Landreth G, Lemmon V: Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *The Journal of biological chemistry* 1999, 274(53):37965-37973.
10. Long KE, Asou H, Snider MD, Lemmon V: The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *The Journal of biological chemistry* 2001, 276(2):1285-1290.
- 55 11. Schaefer AW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, Rapoport I, Kirchhausen T, Beach CM, Landreth G, Lemmon SK, Lemmon V: L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *The Journal of cell biology* 2002, 157(7):1223-1232.
12. Documento WO 2008/151819

- 60 Figuras
- Figura 1: Medición de la captación celular del mAb 9.3 del mAb contra L1CAM en células Skov3ip. Las células Skov3ip se incubaron durante diferentes períodos de tiempo con el mAb L1-9.3 contra L1CAM conjugado con Alexa488. Las muestras se fijaron subsecuentemente y se detectó el anticuerpo unido a la superficie celular mediante el uso de un anticuerpo secundario de cabra-anti-ratón acoplado a Alexa647. Las células en el

punto de tiempo 0' se incubaron en hielo para evitar la internalización de anticuerpos. Las muestras se midieron en un citómetro de flujo de imágenes Amnis ISX y se recolectaron y analizaron 3.000 células mediante el uso del software Amnis IDEAS. (A) muestra una imagen representativa de las células adquiridas en los puntos de tiempo 0 minutos, 60 minutos (B) y 90 minutos (C). El panel de gráficos de abajo muestra la cuantificación respectiva de las muestras. (D) representa el punto de tiempo 0', (E) 60' y 90' (F). El eje y proporciona la frecuencia normalizada y el eje x muestra la intensidad de fluorescencia intracelular respectiva del mAb 9.3 contra L1CAM conjugado con Alexa488 con relación a la intensidad de fluorescencia total de la célula. La tabla debajo de los gráficos muestra el número de celdas incluidas en el análisis (recuentos) y el valor medio del gráfico (media). El experimento se repitió tres veces, se muestra un resultado representativo.

Figura 2: Medición de la captación celular del mAb OV52.24 del anticuerpo contra L1CAM en células Skov3ip.

Las células Skov3ip se incubaron durante diferentes períodos de tiempo con el mAb OV52.24 contra L1 conjugado con Alexa488. Las muestras se fijaron subsecuentemente y se detectó el anticuerpo unido a la superficie celular mediante el uso de un anticuerpo secundario de cabra-anti-ratón acoplado a Alexa647. Las células en el punto de tiempo 0' se incubaron en hielo para evitar la internalización de anticuerpos. Las muestras se midieron en un citómetro de flujo de imágenes Amnis ISX y se recolectaron y analizaron 3.000 células mediante el uso del software Amnis IDEAS. (A) muestra una imagen representativa de las células adquiridas en los puntos de tiempo 0 minutos, 60 minutos (B) y 90 minutos (C). El panel de gráficos de abajo muestra la cuantificación respectiva de las muestras. (D) representa el punto de tiempo 0', (E) 60' y 90' (F). El eje y proporciona la frecuencia normalizada y el eje x muestra la intensidad de fluorescencia intracelular respectiva del mAb OV52.24 contra L1 conjugado con Alexa488 con relación a la intensidad de fluorescencia total de la célula. La tabla debajo de los gráficos muestra el número de celdas incluidas en el análisis (recuento) y el valor medio del gráfico (media). El experimento se repitió tres veces, se muestra un resultado representativo.

Figura 3: Medición de la captación celular de los mAb 9.3 y OV52.24 contra L1CAM en células Skov3ip.

La figura ofrece una descripción general de los resultados de la figura 1 y la figura 2. El panel superior muestra los gráficos para el mAb 9.3 contra L1CAM y el panel inferior para el mAb OV52.24 contra L1CAM para los diferentes puntos de tiempo 0', 60' y 90 minutos.

Figura 4: Medición de la captación celular de los mAb 9.3 y OV52.24 contra L1CAM en células Skov3ip mediante el uso de microscopía de barrido láser confocal.

Las células Skov3ip se incubaron durante 70 minutos con los mAb 9.3 u OV52.24 contra L1CAM conjugado con Alexa488. Las muestras se fijaron subsecuentemente y se detectó el anticuerpo unido a la superficie celular mediante el uso de un anticuerpo secundario de cabra-anti-ratón acoplado a Alexa647. Luego, las muestras se visualizaron en un microscopio de barrido láser confocal Leica SP5 II. Se adquirieron cortes en Z en posiciones z similares. Para cada anticuerpo, se adquirieron y cuantificaron n = 30 células (A). Las imágenes se analizaron mediante el uso de Fiji (ImageJ) y se trazaron como un gráfico de barras que muestra la intensidad de fluorescencia intracelular del mAb 9.3 de L1 y L1-OV52.24 conjugado con Alexa488 con relación a la intensidad de fluorescencia total de la célula (B). El experimento se repitió tres veces, se muestra un resultado representativo. La barra izquierda respectiva durante 40 minutos y 90 minutos, respectivamente, muestra los resultados para el mAb 9.3. La barra derecha respectiva durante 40 minutos y 90 minutos, respectivamente, muestra los resultados para el mAb OV52.24.

Figura 5: Confirmación de la captación celular de los mAb 5G3 y UJ127.11 contra L1CAM en células Skov3ip mediante el uso de microscopía de barrido láser confocal.

Las células Skov3ip se incubaron durante 70 minutos con los mAb 5G3 y UJ127.11 contra L1CAM conjugados con Alexa488. Las muestras se fijaron subsecuentemente y se detectó el anticuerpo unido a la superficie celular mediante el uso de un anticuerpo secundario de cabra-anti-ratón acoplado a Alexa647. Luego, las muestras se visualizaron en un microscopio de barrido láser confocal Leica SP5 II. Se adquirieron cortes en Z en posiciones z similares. Para cada anticuerpo, se adquirieron n=30 células. Se muestra un resultado representativo.

Figura 6: Medición y comparación de la captación celular de los mAb contra L1CAM 9.3, OV52.24, 5G3 y UJ127.11 en células Skov3ip.

Las células Skov3ip se incubaron durante diferentes períodos de tiempo con los mAb contra L1 conjugados con Alexa488. Las muestras se fijaron subsecuentemente y se detectó el anticuerpo unido a la superficie celular mediante el uso de un anticuerpo secundario de cabra-anti-ratón acoplado a Alexa647. Las células en el punto de tiempo 0' se incubaron en hielo para evitar la internalización de anticuerpos. Las muestras se midieron en un citómetro de flujo de imágenes Amnis ISX y se recolectaron y analizaron 5.000 células mediante el uso del software Amnis IDEAS. El panel izquierdo de gráficos muestra el punto de tiempo 0 minutos, el panel central 60 minutos y el panel derecho 90 minutos, respectivamente. El eje y proporciona la frecuencia normalizada y el eje x muestra la intensidad de fluorescencia intracelular respectiva de los mAb contra L1 conjugados con Alexa488 con relación a la intensidad de fluorescencia total de la célula. El valor medio de la intensidad de fluorescencia intracelular relativa para cada condición se da en el gráfico. El experimento se repitió tres veces, se muestra un resultado representativo.

Figura 7: Comparación de la captación celular de los mAb 9.3, OV52.24, 5G3 y UJ127.11 contra L1CAM en células Skov3ip.

La figura proporciona un resumen del análisis representativo de la figura 6. Se trazaron tres experimentos independientes diferentes en base a la intensidad intracelular relativa media de cada experimento para cada mAb contra L1CAM. Los valores se expresan para los gráficos de barras como media \pm DE. Para determinar la probabilidad de aumentos o disminuciones estadísticamente significativos en la internalización de diferentes mAb contra L1CAM, se analizaron tres experimentos independientes mediante el uso de pruebas t de Student bilateral, para datos independientes. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los asteriscos se asignaron como sigue: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Líneas celulares

Las células de carcinoma de ovario humano SKOV3ip se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las líneas celulares fueron autenticadas por el German Resource Center for Biological Material (Braunschweig, Alemania) y en todo el cultivo mediante la evaluación de la morfología típica por parte de los investigadores. Los cultivos negativos para micoplasma se aseguraron mediante pruebas semanales. Las células se cultivaron en medio DMEM (Sigma-Aldrich, Deisenhoffen, Alemania) suplementado con suero de ternero fetal (FCS) inactivado por calor al 10 % (Biochrom, Berlín, Alemania), L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen). Todas las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37 °C y CO₂ al 5 %.

Anticuerpos monoclonales

El mAb L1-9.3 contra L1CAM humano se ha descrito antes [6, 12].

L1-OV52.24 se generó por inmunización de ratones con proteína L1-Fc humana que comprende el ectodomio de L1 o mediante el uso de células SKOV3ip para la inmunización.

Se determinó la secuencia de ADNc de los genes de inmunoglobulina del anticuerpo monoclonal L1-OV52.24 y se muestra arriba (cadena ligera: SEQ ID No: 3 y cadena pesada: SEQ ID No: 4).

Además, se determinó la secuencia de proteínas de las cadenas pesada y ligera (dominio VDJ o VJ, sin dominio constante), respectivamente, de L1-OV52.24 (SEQ ID No: 2 y SEQ ID No: 1). Además, se determinaron las secuencias de las CDR de L1-OV52.24 de acuerdo con la nomenclatura de Kabat. Las secuencias de las CDR de L1-OV52.24 son: KASQNVGTNVA (LCDR1; SEQ ID No: 5), STSYRYS (LCDR2; SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (LCDR3; SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (HCDR1; SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (HCDR2; SEQ ID No: 9) y WNPLAF (HCDR3; SEQ ID No: 10).

Ambos mAb son del isotipo IgG1.

Se obtuvo un mAb de control de isotipo de Bio X Cell (West Lebanon, NH). Los mAb contra L1CAM se conjugaron con Alexa488 mediante el uso de un kit de etiquetado (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 100 µg de anticuerpo con un vial de reactivo de marcaje, se incubaron durante una hora y subsecuentemente se purificaron en una columna. El grado de etiquetado se determinó para asegurar una eficacia de etiquetado similar.

Constantes de unión

Análisis de equilibrio de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

El análisis de unión se realizó mediante el uso de un BIACore 3000 equipado con un chip sensor CM5. Brevemente, se activó un chip BIACore CM5 con EDC/NHS y se capturaron varios niveles de L1-Fc sobre la superficie activada. Los sitios activos restantes fueron bloqueados por etanolamina/HCl. Los L1-mAb se unieron a la superficie de L1-Fc y se dejó que se disociaran con el tiempo. Las fases de asociación y disociación para cada inyección sobre cada superficie de densidad se sometieron a análisis cinético.

Epítopo reconocido

Para determinar la especificidad del epítopo, construimos una serie de proteínas L1-Fc que llevan dominios de Ig distintos (como se describió en [6]). Para el mapeo fino se usaron fragmentos de L1 etiquetados con V5 recombinantes que se describieron recientemente (Gouveia R.M., Morais V.A., Peixoto C. y otros. Production and purification of functional truncated soluble forms of human recombinant L1 cell adhesion glycoprotein from

Spodoptera frugiperda Sf9 cells. Protein Expr Purif 2007; 52: 182-93). Las proteínas recombinantes se usaron en ELISA o en análisis de transferencia Western para mapeo de epítopos.

Ensayos de captación de anticuerpos

5 Para citometría de flujo de imágenes (Imagestream)

Las células Skov3ip se separaron con tripsina/EDTA, se re-suspendieron en medio de cultivo, se contaron y se dividieron en alícuotas de igual número de células (200.000 células). Las células se incubaron a 37 °C durante diferentes puntos de tiempo en presencia continua del anticuerpo marcado (10 µg/ml) o en hielo por un punto de tiempo de 0 minutos. En cada punto de tiempo, las células se sedimentaron a 800 x g, se lavaron una vez con PBS helado y se fijaron con PFA al 4 % (Thermo Fischer) durante 15 minutos sobre hielo. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa-647 a 25 µg/ml (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) durante 20 minutos y posteriormente se lavaron dos veces con PBS.

15 Para microscopía de barrido láser confocal

Se sembraron y cultivaron 25.000 células en portaobjetos µ de 8 pocillos (Ibidi, Munich, Alemania) durante 24 horas. Las células se incubaron a 37 °C durante diferentes puntos de tiempo en presencia continua del anticuerpo marcado (10 µg/ml). En cada punto de tiempo, las células se lavaron una vez con PBS helado y se fijaron con PFA al 4 % (Thermo Fischer) durante 15 minutos sobre hielo. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa-647 a 25 µg/ml (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) durante 20 minutos y posteriormente se lavaron dos veces con PBS.

25 Análisis y citometría de flujo de imágenes

Las muestras se midieron en un Amnis ImageStreamX (ISX) (Amnis Corp., Seattle, Estados Unidos) con un láser de 488 nm ajustado al 100 % y el láser de 561 nm ajustado al 80 % con el objetivo de 60x y la opción de profundidad de campo extendida (EDF) activado. Se registraron los canales 2 y 5, así como también las imágenes de campo claro en el canal 1 y se recolectaron 4.000 células por muestra. Se tomaron alícuotas de células para cada anticuerpo después de la fijación y antes de la contratinción con el anticuerpo anti-ratón-Alexa647 como controles de compensación para los mAb contra L1CAM acoplados a Alexa488. Las células se tiñeron en hielo con los respectivos mAb contra L1 no conjugados a la misma concentración que los anticuerpos conjugados y se contratiñeron con el mismo anticuerpo secundario anti-ratón-Alexa647 para servir como un control de compensación para la contra-tinción con el anticuerpo anti-ratón-Alexa647. Los controles de compensación se adquirieron con los respectivos ajustes de compensación en el ISX.

El análisis de los datos del ISX se realizó con el software IDEAS (Amnis Corp., Seattle, Estados Unidos). Se abrieron archivos de imagen sin procesar y se generó una matriz de compensación mediante el uso de los respectivos archivos de compensación. Las células adquiridas se seleccionaron para las células enfocadas y, subsecuentemente, para las células individuales mediante el uso de las imágenes de campo claro para controlar la activación. Se generó una "máscara de superficie celular" mediante el uso de las imágenes del canal 5, mientras que la intensidad se limitó a un límite inferior de 200 y el límite superior permaneció sin cambios en 4.095 para eliminar el fondo y optimizar la señal. Para el canal 2, el corte de la intensidad inferior se estableció en 150 y el límite superior permaneció sin cambios en 4.095 y se denominó "canal 2". Ambos ajustes se derivaron de la tinción control con el control de isótipo para los mAb contra L1CAM o el anticuerpo secundario solo. Adicionalmente, la "máscara de superficie celular" se dilató en un píxel para incluir los píxeles vecinos en el canal 2. Se generó otra máscara denominada "señal intracelular" que se definió como "canal 2 y no máscara de superficie celular". Finalmente, se generó una característica combinada denominada "intensidad intracelular relativa" con la siguiente definición "señal intracelular/(Intensity_MC_Ch02 * 100). Se trazó el histograma respectivo y se determinó el valor medio. Se aplicó el mismo procedimiento a todas las muestras medidas.

55 Análisis y microscopía de barrido láser confocal

Las muestras se midieron en un microscopio de barrido láser confocal Leica SP5 II (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con detectores HyD. Se excitaron los mAb contra L1 conjugados con Alexa-488 mediante el uso de un láser de argón a 488 nm y se usó una línea de láser HeNe a 633 nm para excitar a Alexa-647. Se adquirieron cortes en Z en posiciones z similares. Para cada anticuerpo, se adquirieron y cuantificaron n = 30 células. Las imágenes se analizaron mediante el uso de Fiji (ImageJ, NIH, Bethesda, Estados Unidos) donde se usó la señal de la contratinción de la superficie celular con el anti-ratón-Alexa-647 para segmentar e identificar los límites de las células individuales y la intensidad de la fluorescencia intracelular y luego se determinó la intensidad celular total. Los resultados se trazaron como un gráfico de barras que muestra la intensidad de fluorescencia intracelular de los mAb L1-9.3 y L1-OV52.24 conjugado con Alexa488 con relación a la intensidad de fluorescencia total de la célula mediante el uso de Excel (Microsoft, Redmond, Estados Unidos).

65 Resultados

- Los mAb L1-9.3 y L1-OV52-54 se unen a distintos epítopos de la superficie celular de la molécula de la superficie celular de L1CAM. El mAb 9.3 reacciona claramente con una proteína de fusión que consiste en el primer dominio de Ig (1.Ig-L1-Fc; [12]). Mediante análisis de transferencia Western, se confirmó que el mAb L1-OV52.24 reconoce el dominio FN III 4-5 de L1. El mAb L1-9.3 se une al primer dominio de Ig mientras que L1-OV52.24 se une a un epítopo en el 4-5. Dominio FN III. El mAb 9.3 tiene una afinidad por L1 de KD (M) = $8,5 * 10^{-11}$ [ver [6]], mientras que el mAb L1-OV52.24 tiene una afinidad por L1 de KD (M) = $2,41 * 10^{-9}$. Se encontró que L1-OV52.24 funciona de manera excelente en experimentos de análisis de transferencia Western y FACS y se encontró que funciona bien en experimentos de inmunohistoquímica (IHC).
- Llevamos a cabo ensayos de internalización en células SKOV3ip mediante el uso de mAb conjugados con Alex-488 como se describe en la sección de materiales y procedimientos anterior. La internalización se midió mediante un análisis Imagestream^X que combina FACS y análisis fluorescente y permite la cuantificación de miles de células. Los datos se analizaron con el software IDEAS. El análisis de L1-9.3 mostró una internalización lenta en los puntos de tiempo 0 minutos, 60 minutos y 90 minutos (Figura 1 A-F) con una media de 7,8 % en el punto de tiempo final. Por el contrario, el mAb L1-OV52.24 se internalizó mucho más rápido y alcanzó un valor medio del 40 % en el punto de tiempo final (Figura 2 A-F). Los datos se comparan directamente en la Figura 3.
- Para verificar estos resultados se llevaron a cabo análisis similares con células adheridas. Las células SKOV3ip se cultivaron en cubreobjetos y se dejaron internalizar con anticuerpos conjugados con Alexa. La cuantificación se realizó mediante microscopía de barrido láser y recuento visual de células. Los ejemplos de tinción se muestran en la Figura 4A y los resultados se resumen en la Figura 4B. Estos resultados confirman los datos obtenidos mediante el análisis Imagestream y muestran que el mAb L1-OV52.24 induce una tasa de internalización casi diez veces mayor. Los resultados son inesperados y sugieren que el mAb L1-OV52.24 es adecuado para la administración de conjugados anticuerpo-fármaco.
- ### Ejemplo 2
- Materiales y procedimientos
- Líneas celulares
- Las células de carcinoma de ovario humano SKOV3ip se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las líneas celulares fueron autenticadas por el German Resource Center for Biological Material (Braunschweig, Alemania) y en todo el cultivo mediante la evaluación de la morfología típica por parte de los investigadores. Los cultivos negativos para micoplasma se aseguraron mediante pruebas semanales. Las células se cultivaron en medio DMEM (Sigma-Aldrich, Deisenhoffen, Alemania) suplementado con suero de ternero fetal (FCS) inactivado por calor al 10 % (Biochrom, Berlín, Alemania), L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen). Todas las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37 °C y CO₂ al 5 %.
- Anticuerpos monoclonales
- Los mAb L1-9.3, 5G3 y UJ127.11 contra L1CAM humano se han descrito antes [6].
- L1-OV52.24 se generó por inmunización de ratones con proteína L1-Fc humana que comprende el ectodomino de L1 o mediante el uso de células SKOV3ip para la inmunización.
- Se determinó la secuencia de ADNc de los genes de inmunoglobulina del anticuerpo monoclonal L1-OV52.24 y se muestra arriba (cadena ligera: SEQ ID No: 3 y cadena pesada: SEQ ID No: 4).
- Además, se determinó la secuencia de proteínas de las cadenas pesada y ligera (dominio VDJ o VJ, sin dominio constante), respectivamente, de L1-OV52.24 (SEQ ID No: 2 y SEQ ID No: 1). Además, se determinaron las secuencias de las CDR de L1-OV52.24 de acuerdo con la nomenclatura de Kabat. Las secuencias de las CDR de L1-OV52.24 son: KASQNVGTNVA (LCDR1; SEQ ID No: 5), STSYRYS (LCDR2; SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (LCDR3; SEQ ID No: 7), FNIKDYYMQ (HCDR1; SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (HCDR2; SEQ ID No: 9) y WNPLAF (HCDR3; SEQ ID No: 10).
- Los mAb L1-9.3, L1-OV52.24 y UJ127.11 son del isótipo IgG1. El mAb 5G3 es del isótipo IgG2a. Se obtuvieron los mAb de control de isótipos correspondientes de Bio X Cell (West Lebanon, NH). Los mAb contra L1CAM se conjugaron con Alexa488 mediante el uso de un kit de etiquetado (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 100 µg de anticuerpo con un vial de reactivo de marcaje, se incubaron durante una hora y subsecuentemente se purificaron en una columna. El grado de marcado se determinó para asegurar una eficacia de marcado similar. El mAb 5G3 conjugado con Alexa488 se adquirió de Novus Biologicals (Littleton, Estados Unidos).
- Ensayos de captación de anticuerpos

Para citometría de flujo de imágenes (Imagestream)

Las células Skov3ip se separaron con tripsina/EDTA, se re-suspendieron en medio de cultivo, se contaron y se dividieron en alícuotas de igual número de células (200.000 células). Las células se incubaron a 37 °C durante diferentes puntos de tiempo en presencia continua del anticuerpo marcado (10 µg/ml) o en hielo por un punto de tiempo de 0 minutos. En cada punto de tiempo, las células se sedimentaron a 800 x g, se lavaron una vez con PBS helado y se fijaron con PFA al 4 % (Thermo Fischer) durante 15 minutos sobre hielo. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa-647 a 25 µg/ml (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) durante 20 minutos y posteriormente se lavaron dos veces con PBS.

10 Para microscopía de barrido láser confocal

Se sembraron y cultivaron 25.000 células en portaobjetos μ de 8 pocillos (Ibidi, Munich, Alemania) durante 24 horas. Las células se incubaron a 37 °C durante diferentes puntos de tiempo en presencia continua del anticuerpo marcado (10 µg/ml). En cada punto de tiempo, las células se lavaron una vez con PBS helado y se fijaron con PFA al 4 % (Thermo Fischer) durante 15 minutos sobre hielo. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa-647 a 25 µg/ml (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) durante 20 minutos y posteriormente se lavaron dos veces con PBS.

20 Análisis y citometría de flujo de imágenes

Las muestras se midieron en un Amnis ImageStreamX (ISX) (Amnis Corp., Seattle, Estados Unidos) con un láser de 488 nm ajustado al 100 % y el láser de 561 nm ajustado al 80 % con el objetivo de 60x y la opción de profundidad de campo extendida (EDF) activado. Se registraron los canales 2 y 5, así como también las imágenes de campo claro en el canal 1 y se recolectaron 10.000 células por muestra. Se tomaron alícuotas de células para cada anticuerpo después de la fijación y antes de la contratinción con el anticuerpo anti-ratón-Alexa647 como controles de compensación para los mAb contra L1 acoplados a Alexa488. Las células se tiñeron en hielo con los respectivos mAb contra L1 no conjugados a la misma concentración que los anticuerpos conjugados y se contra tiñeron con el mismo anticuerpo secundario anti-ratón-Alexa647 para servir como un control de compensación para la contratinación con el anticuerpo anti-ratón-Alexa647. Los controles de compensación se adquirieron con los respectivos ajustes de compensación en el ISX.

El análisis de los datos del ISX se realizó con el software IDEAS (Amnis Corp., Seattle, Estados Unidos). Se abrieron archivos de imagen sin procesar y se generó una matriz de compensación mediante el uso de los respectivos archivos de compensación. Las células adquiridas se seleccionaron para las células enfocadas y, subsecuentemente, para las células individuales mediante el uso de las imágenes de campo claro para controlar la activación. Se generó una "máscara de superficie celular" mediante el uso de las imágenes del canal 5, mientras que la intensidad se limitó a un límite inferior de 200 y el límite superior permaneció sin cambios en 4.095 para eliminar el fondo y optimizar la señal. Para el canal 2, el corte de la intensidad inferior se estableció en 150 y el límite superior permaneció sin cambios en 4.095 y se denominó "canal 2". Ambos ajustes se derivaron de la tinción control con el control de isotypio para los mAb contra L1 o el anticuerpo secundario solo. Adicionalmente, la "máscara de superficie celular" se dilató en un píxel para incluir los píxeles vecinos en el canal 2. Se generó otra máscara denominada "señal intracelular" que se definió como "canal 2 y no máscara de superficie celular". Finalmente, se generó una característica combinada denominada "intensidad intracelular relativa" con la siguiente definición "señal intracelular/(Intensity_MC_Ch02 * 100). Se trazó el histograma respectivo y se determinó el valor medio. Se aplicó el mismo procedimiento a todas las muestras medidas.

Microscopía de barrido láser confocal

50 Las muestras se midieron en un microscopio de barrido láser confocal Leica SP5 II (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con detectores HyD. Se excitaron los mAb contra L1 conjugados con Alexa-488 mediante el uso de un láser de argón a 488 nm y se usó una línea de láser HeNe a 633 nm para excitar a Alexa-647. Se adquirieron cortes en Z en posiciones z similares. Para cada anticuerpo, se adquirieron n=30 células. Se muestran imágenes representativas.

55 Estadística

La probabilidad de aumentos o disminuciones estadísticamente significativos entre las condiciones de al menos tres experimentos independientes se determinó mediante el uso de la prueba t de Student. Se realizaron pruebas t bilaterales para datos independientes. Los valores se expresan para los gráficos de barras como media ± DE. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. La significancia en los gráficos se ilustró mediante el uso de asteriscos. Los asteriscos se asignaron como sigue: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Resultados

65 Los resultados del Ejemplo 2 se muestran en las Figuras 5 a la 7. Llevamos a cabo ensayos de internalización en células SKOV3ip mediante el uso de mAb conjugados con Alex-488 como se describe en la sección de materiales y

procedimientos anterior. La internalización se midió mediante un análisis Imagestream^X que combina FACS y análisis fluorescente y permite la cuantificación de miles de células. Los datos se analizaron con el software IDEAS. El análisis mostró una internalización lenta en los puntos de tiempo 0 minutos, 60 minutos y 90 minutos para los anticuerpos monoclonales L1-9.3, 5G3 y UJ127.11 de la técnica anterior (Figura 6). Por el contrario, el mAb L1-
5 OV52.24 de la presente invención se internalizó mucho más rápido y alcanzó un valor medio del 41,7 % en el punto
de tiempo final (Figura 6). Los datos se resumen en la Figura 7. Se encontró sorprendentemente que la
internalización de L1-OV52.24 a 90' es estadísticamente más alta que la internalización de cualquiera de los
anticuerpos monoclonales 9.3, 5G3 y UJ127.11 anti-L1 de la técnica anterior, con un valor de $p \leq 0,01$,
respectivamente.

10 Para verificar estos resultados, se llevó a cabo un análisis similar con células adjuntas. Las células SKOV3ip se
cultivaron en cubreobjetos y se dejaron internalizar con anticuerpos conjugados con Alexa. La cuantificación se
realizó mediante microscopía de barrido láser y recuento visual de células. Los ejemplos de tinción se muestran en
la Figura 5. Estos resultados confirman los datos obtenidos mediante el análisis Imagestream y muestran que el mAb
15 L1-OV52.24 induce una tasa de internalización sorprendentemente alta en comparación con los anticuerpos de la
técnica anterior dirigidos contra L1CAM. Los resultados son inesperados y sugieren que el mAb L1-OV52.24 es
adecuado para la administración de conjugados anticuerpo-fármaco.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión que se une a L1, en la que la molécula de unión
 - 5 i. es:
 - a) un anticuerpo monoclonal anti-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, (scFv)₂, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo y un minicuerpo, o
 - b) se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monocatenario, un scFv y un multímero de scFv, un diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo, un fragmento de anticuerpo seleccionado de un Fab, un TandAb, un flexicuerpo y un anticuerpo biespecífico, y/o
 - c) un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano o uno de unión a antígeno, y
 - 15 ii. comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) KASQNVGTNVA (LCDR1; SEQ ID No: 5), STSYRYS (LCDR2; SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (LCDR3; SEQ ID No: 7), FNIKDYMQ (HCDR1; SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFRG (HCDR2; SEQ ID No: 9) y WNPLAF (HCDR3; SEQ ID No: 10), y
 - 10 iii. se internaliza en una célula SKOV3ip que expresa L1.
2. La molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la molécula de unión es un anticuerpo monoclonal anti-L1, o
- 20 un fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, (scFv)₂, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo y un minicuerpo.
3. La molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la molécula de unión se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monocatenario, preferentemente seleccionado de un scFv y un multímero de scFv, como un diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo, un Fab, un TandAb, un flexicuerpo y un anticuerpo biespecífico.
- 25 4. La molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la molécula de unión es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 30 5. La molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se une a L1 con una afinidad (KD) de al menos 10⁻⁹ M, preferentemente de al menos 10⁻¹⁰ M.
- 35 6. La molécula de unión de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal comprende, preferentemente, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 1 o en la que la cadena ligera está codificada por la SEQ ID No: 3, y en la que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo monoclonal comprende, preferentemente, la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 2 o en la que la cadena pesada está codificada por la SEQ ID No: 4, un fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado del grupo que consiste en Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, (scFv)₂, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo y un minicuerpo.
- 40 7. La molécula de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
 - 45 a) unida a una sustancia terapéuticamente activa, preferentemente a un compuesto quimioterapéutico, preferentemente seleccionado de un agente alquilante, un antibiótico antineoplásico, un antimetabolito y un derivado de fuente natural, un compuesto citotóxico, un compuesto citostático, una citocina, una nanopartícula, o un radionúclido y/o
 - 50 b) unida a un compuesto de diagnóstico, preferentemente seleccionado de un radionúclido, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un colorante o una enzima,
 - 55 con mayor preferencia en la que la sustancia terapéuticamente activa es un compuesto quimioterapéutico o un compuesto citotóxico o un compuesto citostático seleccionado de un agente que daña el ADN, en particular actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino, doxorubicina, etopósido, verapamilo, podofilotoxina, 5-FU, a derivado de fuente natural y un taxano, preferentemente paclitaxel y carboplatino, o con mayor preferencia en la que la molécula de unión se une covalentemente a una sustancia terapéuticamente activa de (a) y/o al compuesto de diagnóstico de (b), opcionalmente mediante un enlazador.
 - 60 8. Una célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-L1 de la reivindicación 1, 2 o 6.

9. Un ácido nucleico
- (i) que codifica una molécula de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y/o
(ii) que comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ ID No: 3 y de acuerdo con la SEQ ID No: 4, y/o
5 (iii) que comprende secuencias que codifican las regiones determinantes de complementariedad (CDR)
KASQNVGTNVA (LCDR1; SEQ ID No: 5), STSYRYS (LCDR2; SEQ ID No: 6), QQYNTYPYT (LCDR3; SEQ ID No:
7), FNIKDYYMQ (HCDR1; SEQ ID No: 8), WIDPENGKTVFDPKFGRG (HCDR2; SEQ ID No: 9) y WNPLAF (HCDR3;
SEQ ID No: 10),
- 10 preferentemente en la que el ácido nucleico es parte de un vector.
10. Uso de una molécula de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como un agente de diagnóstico *in vitro* o como un agente biotecnológico *in vitro*.
- 15 11. Una molécula de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso como medicamento o
agente de diagnóstico.
- 20 12. Una molécula de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento o
prevención de una enfermedad tumoral, preferentemente en la que la enfermedad tumoral es una enfermedad
tumoral epitelial y/o se selecciona del grupo que consiste en astrocitoma, oligodendrogloma, meningioma,
neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma, melanoma, cáncer de páncreas,
carcinoma de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de
endometrio, cáncer renal, neuroblastoma, carcinoma escamoso, meduloblastoma, hepatoma, cáncer de colon,
mesotelioma y carcinoma epidermoide.
- 25 13. Una composición farmacéutica, que comprende una molécula de unión de cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 7 y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

Figura 1

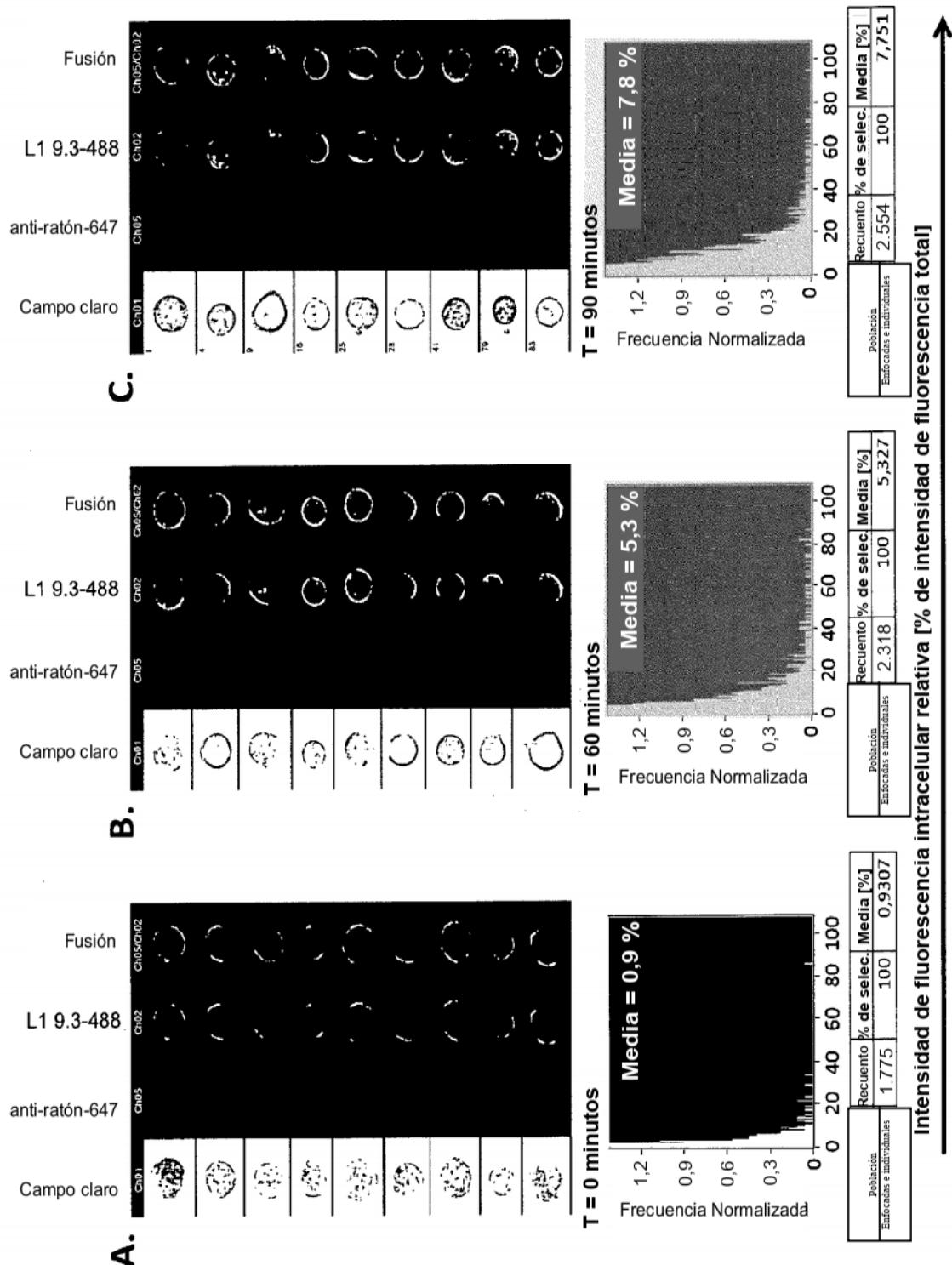


Figura 2

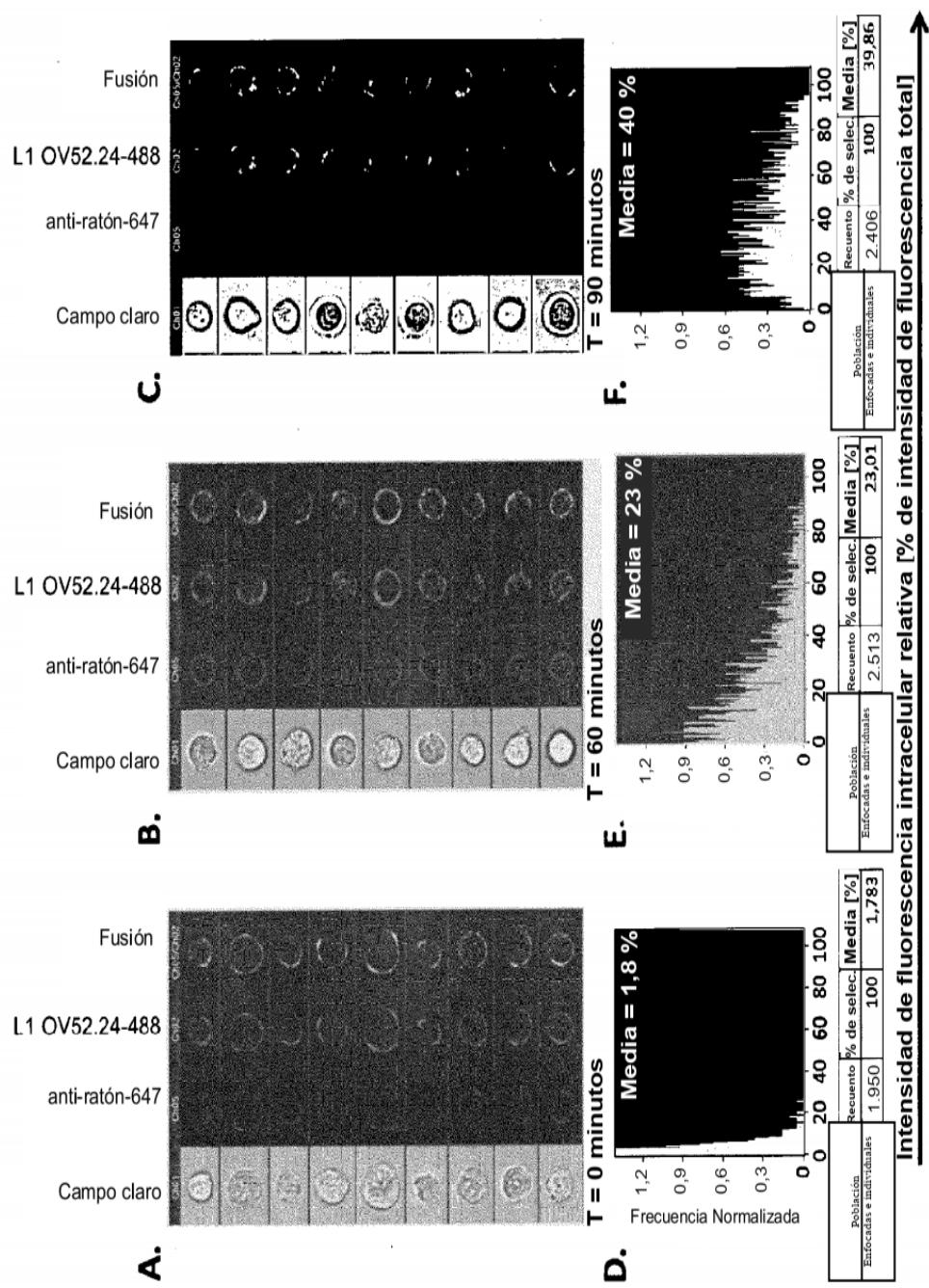


Figura 3

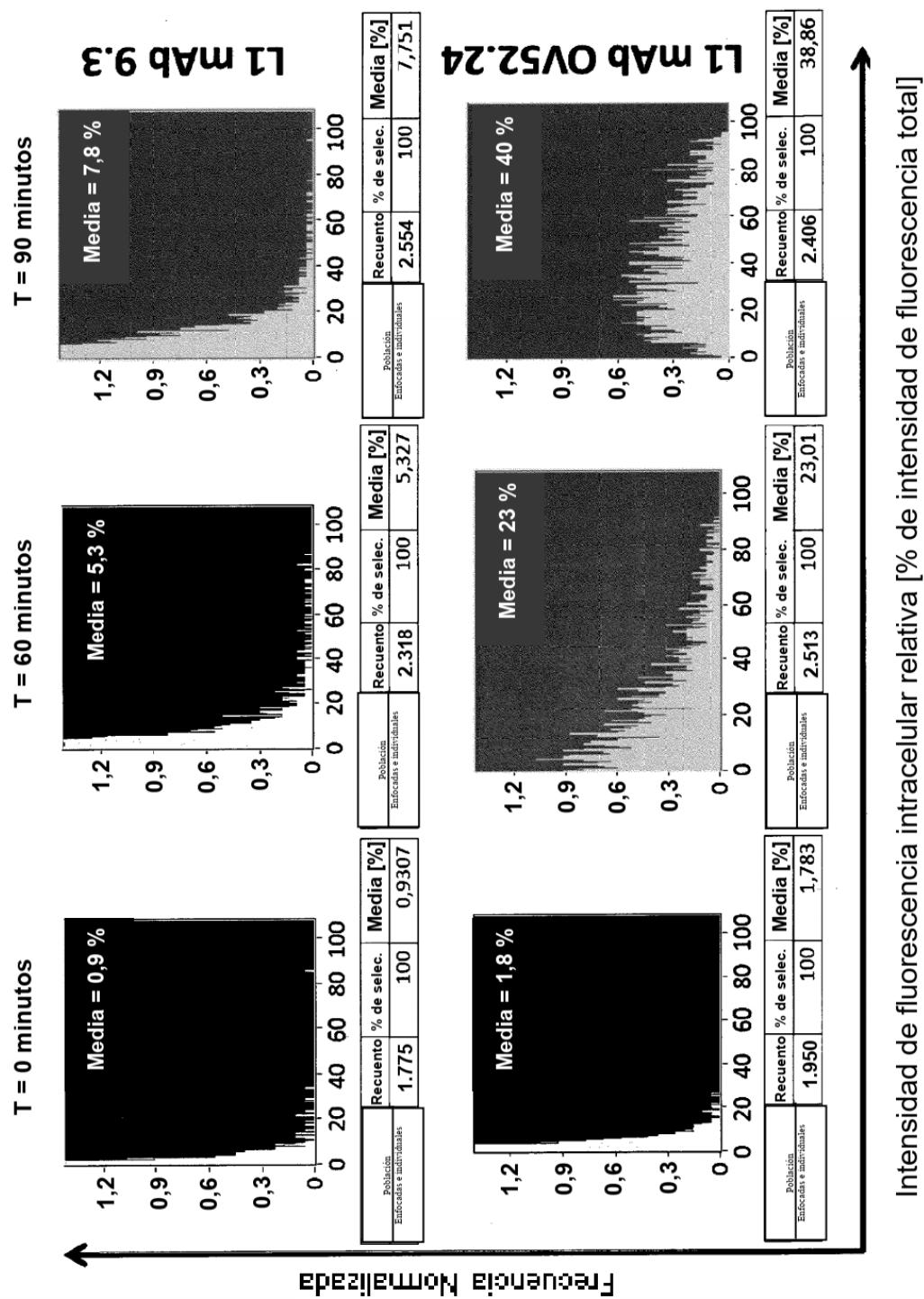


Figura 4

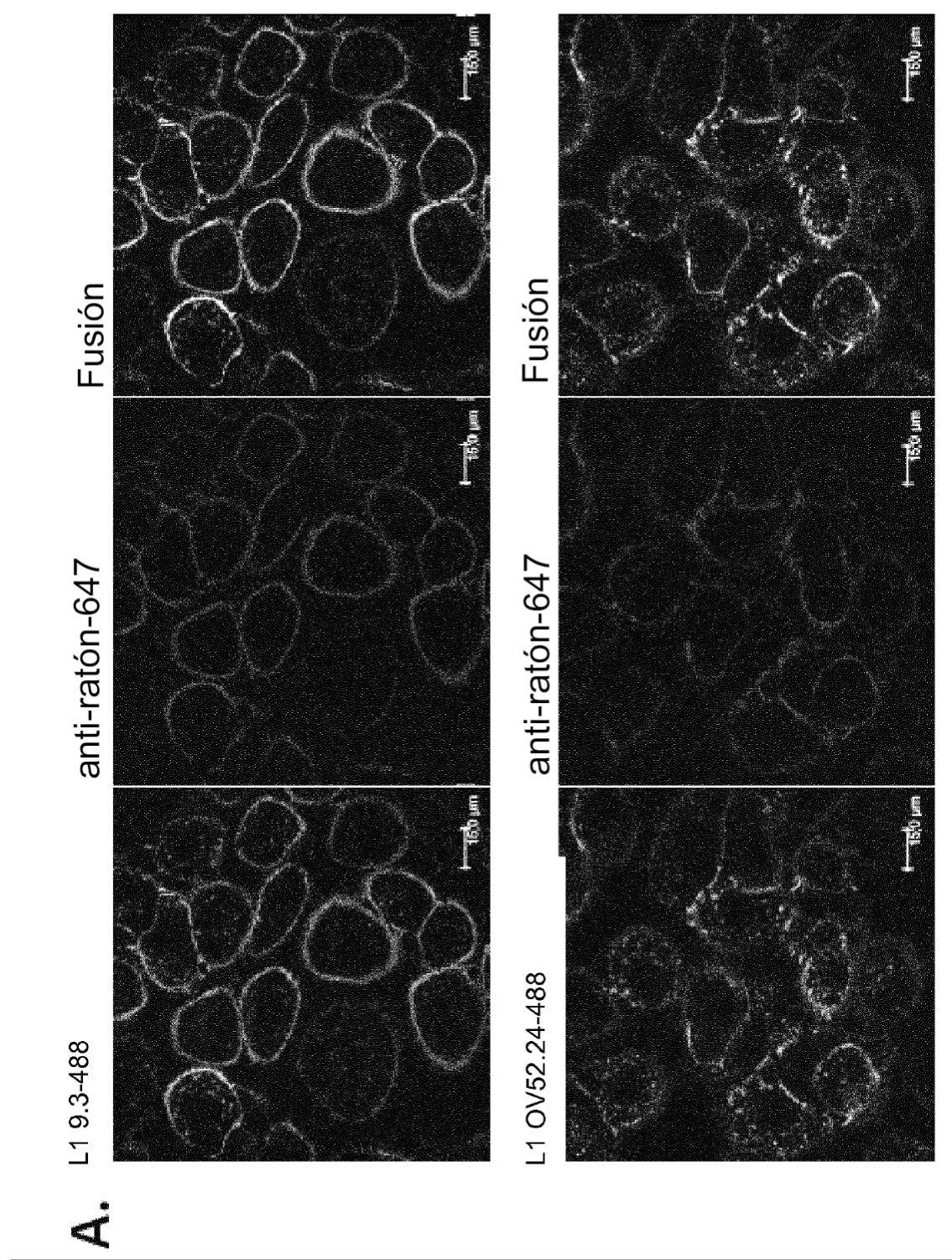


Figura 4 (continuación)

B.

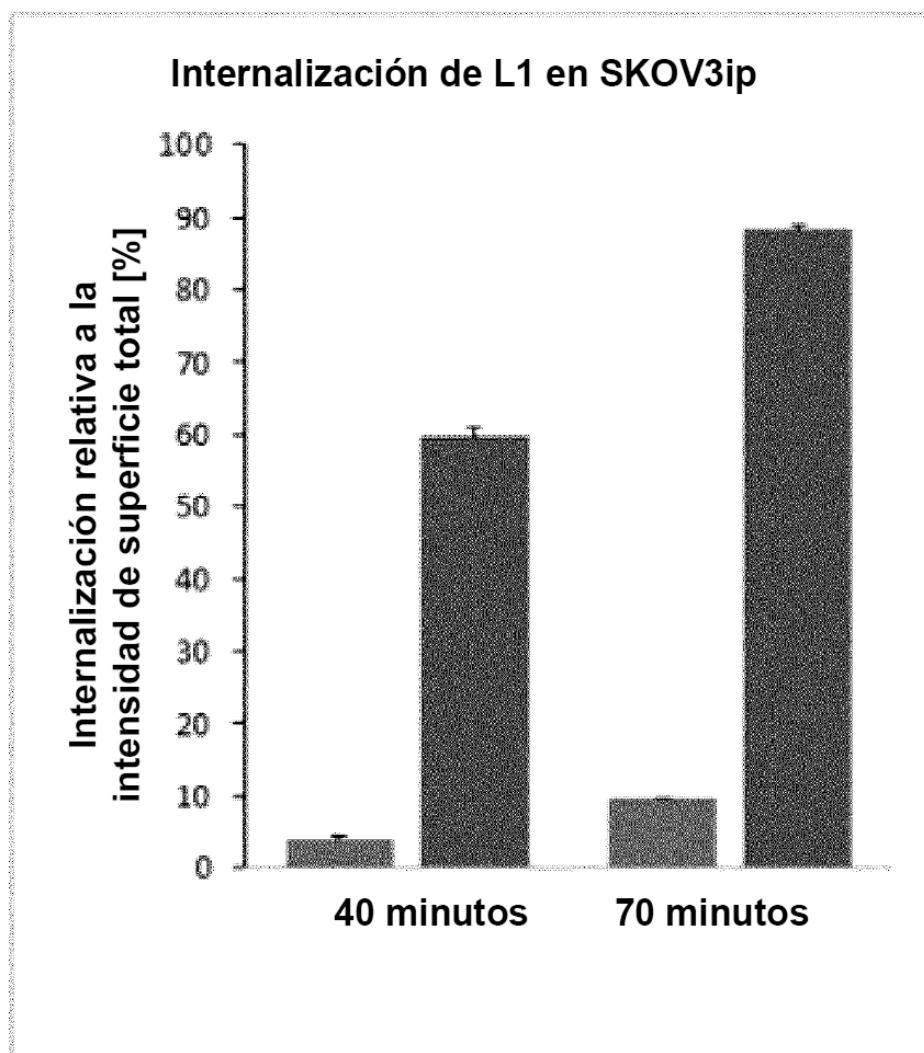


Figura 5

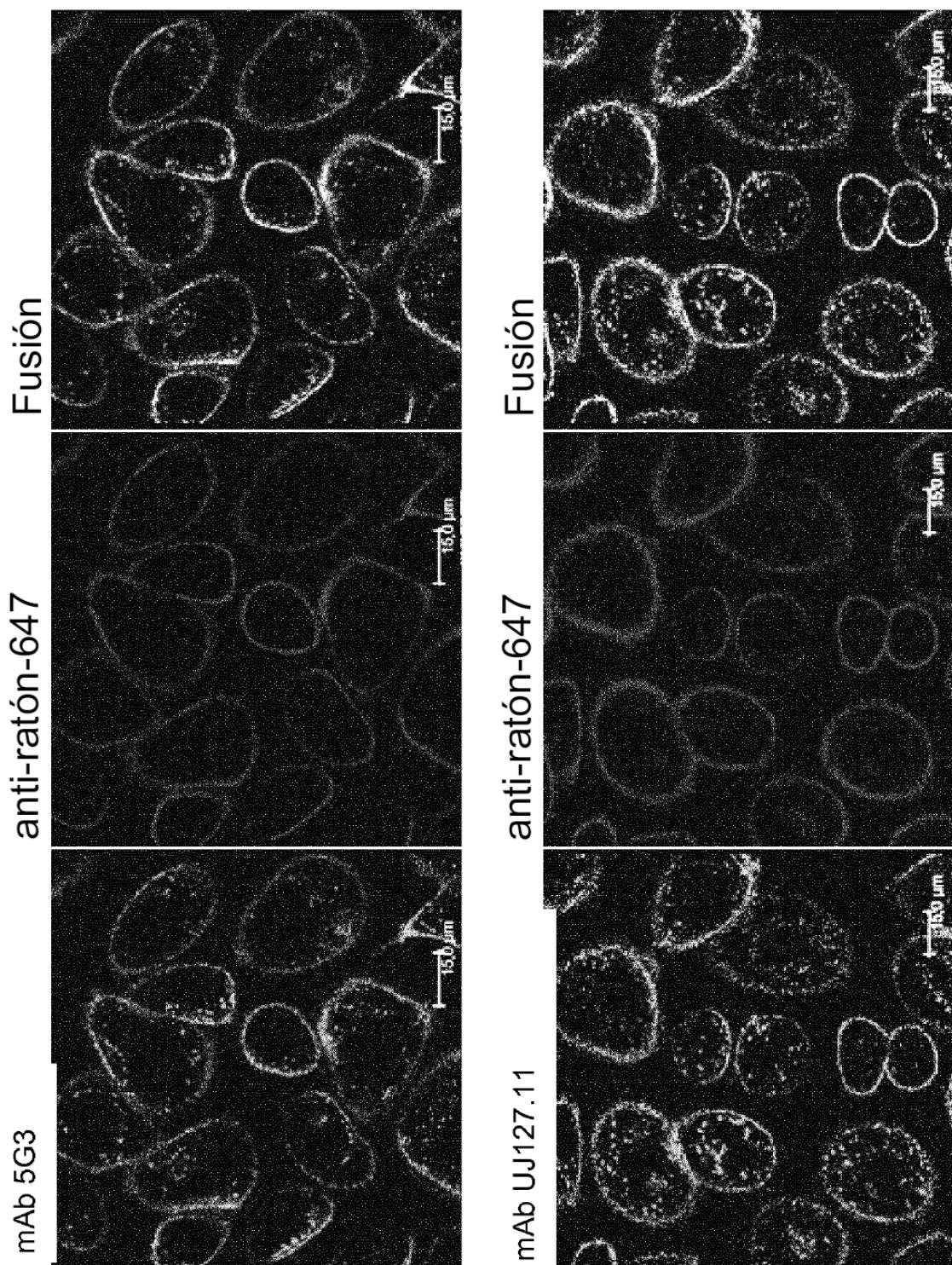


Figura 6

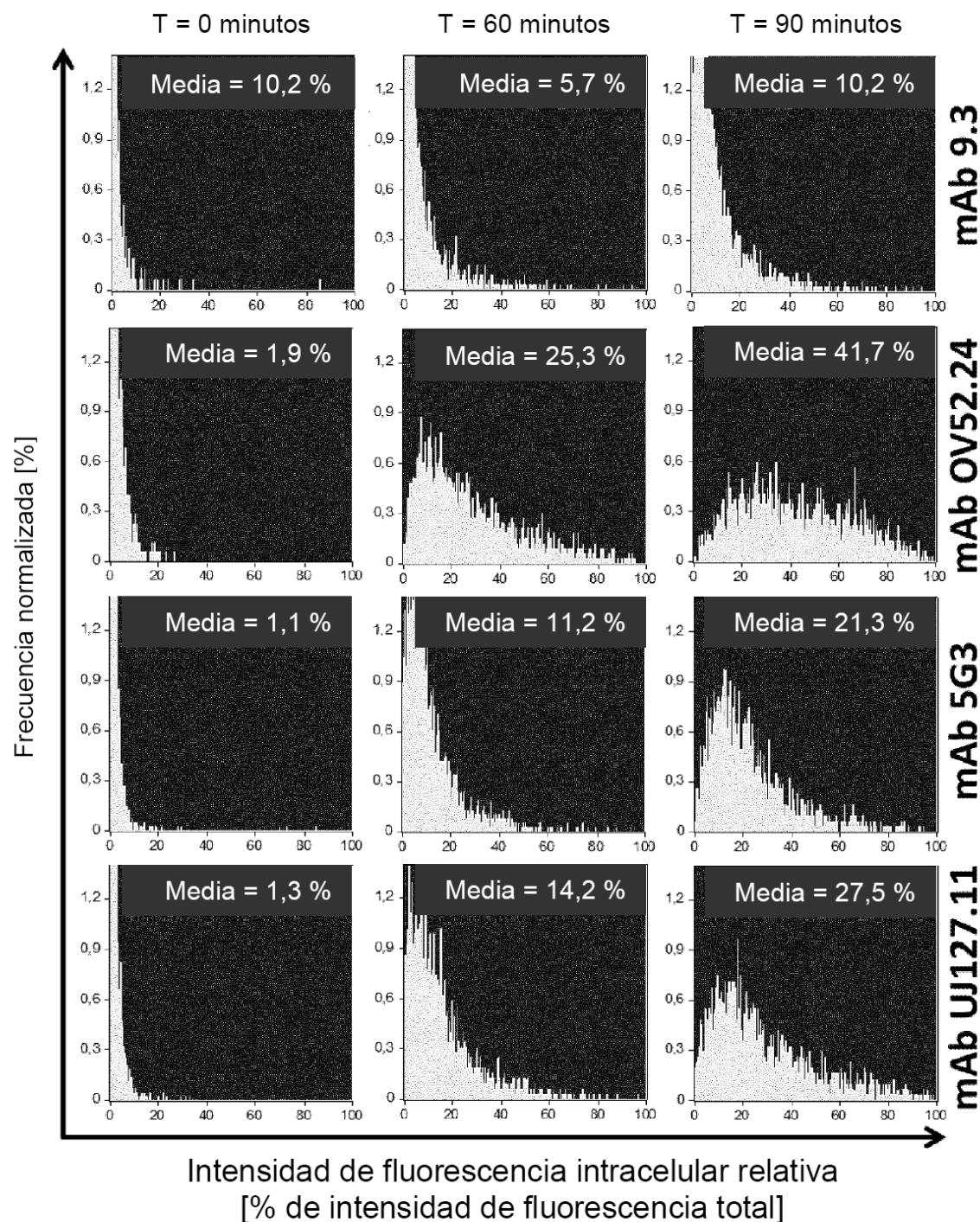


Figura 7

