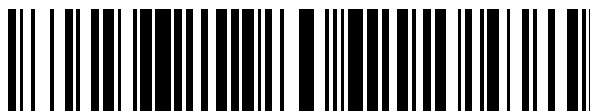


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 626**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04760956 .5**
96 Fecha de presentación: **10.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1633784**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **COMPOSICIONES DE ANTICUERPO OVR110 Y PROCEDIMIENTO DE USO.**

30 Prioridad:
09.05.2003 US 469555 P
12.03.2004 US 552959 P
25.03.2004 US 556464 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2011

73 Titular/es:
DIADEXUS, INC.
343 OYSTER POINT BOULEVARD
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:
PILKINGTON, Glenn;
KELLER, Gilbert-Andre;
LI, Wenlu;
CORRAL, Laura;
SIMON, Iris y
PAPKOFF, Jackie

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 626 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

Composiciones de anticuerpo Ovr110 y procedimientos de uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de anticuerpo anti-Ovr110 y anticuerpos anti-Ovr110 para su uso en procedimientos de destrucción de células de cánceres ovárico, pancreático, de pulmón o mamario que expresan Ovr110.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer de los ovarios es la cuarta causa más común de muerte por cáncer en mujeres en los Estados Unidos, con más de 23.000 casos nuevos y casi 14.000 muertes pronosticadas para el año 2001. Shridhar, V. y col., Cancer Res. 61(15): 5895-904 (2001); Memarzadeh, S. & Berek, J. S., J. Reprod. Med. 46(7): 621-29 (2001). La frecuencia de cáncer ovárico es una preocupación grave a nivel mundial, con aproximadamente 191.000 casos nuevos pronosticados anualmente. Runnebaum, I. B. & Stickeler, E., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127(2): 73-79 (2001). Desafortunadamente, las mujeres con cáncer ovárico son típicamente asintomáticas hasta que la enfermedad se ha metastatizado. Debido a que la exploración eficaz de cáncer ovárico no está disponible, casi el 70% de mujeres diagnosticadas tienen un estado de cáncer avanzado con un índice de supervivencia de cinco años de ~25-30%. Memarzadeh, S. & Berek, J. S., mencionado anteriormente; Nunn, D. y col., Obstet. Gynecol. Surv. 55(12): 746-51. Por el contrario, las mujeres diagnosticadas con cáncer ovárico de fase temprana disfrutan de índices de supervivencia considerablemente más elevados. Wemess, B. A. & Eltabbakh, G. H., Int'l. J. Gynecol. Pathol. 20(1): 48-63 (2001). Aunque nuestra comprensión de la etiología del cáncer ovárico es incompleta, los resultados de la investigación exhaustiva en esta área apuntan a una combinación factores de edad, genéticos, reproductivos y dietéticos/ambientales. La edad es un factor de riesgo clave en el desarrollo de cáncer ovárico: mientras que el riesgo de desarrollar cáncer ovárico antes de los 30 años de edad es escaso, la frecuencia de cáncer ovárico aumenta linealmente entre las edades de 30 a 50, aumentando a una velocidad más lenta a partir de entonces, siendo la frecuencia más elevada entre mujeres sexagenarias. Jeanne M. Schilder y col., Hereditary Ovarian Cancer: Clinical Syndromes and Management, en Ovarian Cancer 182 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001).

30 Con respecto a factores genéticos, una historia familiar de cáncer ovárico es el factor de riesgo más significativo en el desarrollo de la enfermedad, dependiendo ese riesgo del número de miembros de la familia afectados, el grado de su relación con la mujer y qué parientes de primer grado particulares están afectados por la enfermedad. *Id.* Se han asociado mutaciones en varios genes con cáncer ovárico, incluyendo BRCA1 y BRCA2, ambos de los cuales juegan un papel clave en el desarrollo de cáncer ovárico, así como hMSH2 y hMLH1, ambos de los cuales están asociados con cáncer de colon no asociado a poliposis hereditario. Katherine Y. Look, Epidemiology, Etiology, and Screening of Ovarian Cancer, en Ovarian Cancer 169, 171-73 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001). BRCA1, localizado en el cromosoma 17 y BRCA2, localizado en el cromosoma 13 son genes supresores de tumores implicados en la reparación del ADN; las mutaciones en estos genes están relacionadas con casi el 10% de cánceres ovárico. *Id.* en 171-72; Schilder y col., mencionado anteriormente en 185-86. hMSH2 y hMLH1 están asociados con reparación de desapareamiento de ADN y están localizados en los cromosomas 2 y 3, respectivamente; se ha informado que casi el 3% de carcinomas ováricos hereditarios se deben a mutaciones en estos genes. Véase, mencionado anteriormente en 173; Schilder y col., mencionado anteriormente en 184, 188-89.

40 Los factores reproductivos también se han asociado con un riesgo aumentado o reducido de cáncer ovárico. La menopausia tardía, nuliparidad y edad temprana de menarquía todos se han relacionado con riesgo elevado de cáncer de ovárico. Schilder y col., mencionado anteriormente en 182. Una teoría tiene la hipótesis de que estos factores aumentan el número de ciclos ovulatorios durante el transcurso de la vida de la mujer, que conducen a "ovulación incesante", que se piensa que es la causa principal de mutaciones del epitelio ovárico. *Id.*; Laura J. Havrilesky & Andrew Berchuck, Molecular Alterations in Sporadic Ovarian Cancer, en Ovarian Cancer 25 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001). Las mutaciones se pueden explicar mediante el hecho de que la ovulación da como resultado la destrucción y reparación de ese epitelio, necesitando una división celular aumentada, aumentando de ese modo la posibilidad de que ocurra una mutación no detectada. *Id.* El apoyo de esta teoría se puede encontrar en el hecho de que el embarazo, la lactación y el uso de anticonceptivos orales, los cuales todos suprimen la ovulación, confieren un efecto protector con el respecto al desarrollo de cáncer ovárico. *Id.*

55 Entre los factores dietéticos/ambientales, parece haber una asociación entre una ingesta elevada de grasa animal o carne roja y cáncer ovárico, mientras que el antioxidante vitamina A, que evita la formación de radicales libres y también ayuda a mantener la diferenciación celular normal puede ofrecer un efecto protector. Véase, mencionado anteriormente en 169. Informes también han asociado asbestos y trisilicato de magnesio (talco), de los cuales el último puede estar presente en diafragmas y toallas sanitarias. *Id.* En 169-70.

Los procedimientos de exploración actuales de cáncer ovárico, aunque tienen alguna utilidad, están bastante limitados en su capacidad de diagnóstico, un problema que es particularmente agudo en fases tempranas de la progresión del cáncer cuando la enfermedad es típicamente asintomática y sin embargo se puede tratar más

fácilmente. Walter J. Burdette, *Cancer: Etiology, Diagnosis, and Treatment* 166 (1998); Memarzadeh & Berek, mencionado anteriormente; Runnebaum & Stickeler, mencionado anteriormente; Werness & Eltabbakh, mencionado anteriormente. Los ensayos de exploración usados comúnmente incluyen examen pélvico rectovaginal semestral, radioinmunoensayo para detectar el marcador tumoral en suero CA-125 y ultrasonido transvaginal. Burdette, mencionado anteriormente en 166.

El examen pélvico no ha conseguido producir números adecuados de diagnósticos tempranos y los otros procedimientos no son suficientemente precisos. *Id.* Un estudio informó que únicamente el 15% de pacientes que sufrían de cáncer ovárico se diagnosticaron con la enfermedad en el momento de su examen pélvico. Véase, mencionado anteriormente en 174. Adicionalmente, el ensayo de CA-125 es propenso a proporcionar falsos positivos en mujeres pre-menopáusicas y se ha informado que tiene un valor predictivo bajo en mujeres post-menopáusicas. *Id.* En 174-175. Aunque el ultrasonido transvaginal es actualmente el procedimiento preferido para exploración de cáncer ovárico, es incapaz de distinguir fiablemente entre tumores benignos y malignos y tampoco puede localizar malignidades peritoneales principales o cáncer ovárico si el tamaño del ovario es normal. Schilder y col., mencionado anteriormente en 194-95. Aunque el ensayo genético para determinar mutaciones de los genes BRCA1, BRCA2, hMSH2 y hMLH1 está disponible actualmente, estos ensayos pueden ser demasiado costosos para algunos pacientes y también pueden producir falsos negativos o resultados indeterminados. Schilder y col., mencionado anteriormente en 191-94.

Los niveles de CA125 en suero elevados se han asociado con una frecuencia aumentada de cáncer ovárico en un estudio de cohorte prospectivo. Jacobs, I.J., y col., *Risk of diagnosis of ovarian cancer after raised serum CA 125 concentration: a prospective cohort study.* *Bmj*, 1996. 313(7069): pág. 1355-8. CA125 es un antígeno asociado a tumor que se ha usado clínicamente para supervisar pacientes con carcinomas ováricos epiteliales. Aproximadamente 9.320 mujeres post-menopáusicas se sometieron a una exploración inicial y un promedio de 2,8 exploraciones anuales con el ensayo de CA-125 y se realizó el seguimiento durante un promedio de 6,8 años. Se identificaron cuarenta y nueve cánceres. Una concentración de CA-125 en suero de al menos 30 U/ml estaba asociada con un riesgo relativo de 35,9 (95% de intervalo de confianza (IC) 18,3-70,4) durante el primer año después de la exploración y un riesgo relativo de 14,3 (95% (IC) 8,5-24,4) durante los cinco años después de la exploración. A una concentración de CA-125 de 100 U/ml, los riesgos relativos fueron 204,8 y 74,5, respectivamente. Las mujeres con niveles de CA-125 por debajo de 30 U/ml tuvieron riesgos de 0,13 y 0,54, respectivamente.

Otros marcadores de interés son HE4 y mesotelina, véase Urban y col. *Ovarian cancer screening Hematol Oncol Clin NorthAm.* 2003 Aug; 17(4): 989-1005; Hellstrom y col. La proteína HE4 (WFDC2) es un biomarcador de carcinoma ovárico, *Cancer Res.* 2003 Jul 1; 63(13): 3695-700; Ordonez, *Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis, Am J Surg Pathol.* 2003 Nov; 27(11): 1418-28.

La determinación de la fase del cancer ovárico que se consigue a través de la exploración quirúrgica, es crucial para determinar el ciclo de tratamiento y el manejo de la enfermedad. *AJCC Cancer Staging Handbook* 187 (Irvin D. Fleming y col. eds., 5ª ed. 1998); Burdette, mencionado anteriormente en 170; Memarzadeh & Berek, mencionado anteriormente; Shridhar y col., mencionado anteriormente. La determinación de la fase se realiza por referencia al sistema de clasificación desarrollado por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia. David H. Moore, *Primary Surgical Management of Early Epithelial Ovarian Carcinoma*, en *Ovarian Cancer* 203 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001); Fleming y col. eds., mencionado anteriormente en 188. El cancer ovárico de fase I se caracteriza por crecimiento tumoral que está limitado a los ovarios y comprende tres subfases. *Id.* En la subfase IA, el crecimiento del tumor está limitado a un ovario, no existe tumor en la superficie externa del ovario, la cápsula ovárica está intacta y no están presentes células malignas en el líquido ascítico o lavados peritoneales. *Id.* La subfase IB es idéntica a A1, con la excepción de que el crecimiento del tumor está limitado a ambos ovarios. *Id.* La subfase IC se refiere a la presencia de crecimiento tumoral limitado a uno o ambos ovarios y también incluye una o más de las siguientes características: ruptura de la cápsula, crecimiento tumoral en la superficie de uno o ambos ovarios y células malignas presentes en líquido ascítico o lavados peritoneales. *Id.*

El cáncer ovárico de fase II se refiere a crecimiento tumoral que implica uno o ambos ovarios, junto con extensión pélvica. *Id.* La subfase IIA implica extensión y/o implantes en el útero y/o las trompas de Falopio, sin células malignas en el líquido ascítico o los lavados peritoneales, mientras que la subfase IIB implica extensión a otros órganos y tejidos pélvicos, nuevamente sin células malignas en el líquido ascítico o lavados peritoneales. *Id.* La subfase IIC implica extensión pélvica al igual que IIA o IIB, pero con células malignas en el líquido ascítico o lavados peritoneales. *Id.*

El cáncer ovárico de fase III implica crecimiento tumoral en uno o ambos ovarios, con metástasis peritoneal más allá de la pelvis confirmada mediante microscopio y/o metástasis en los ganglios linfáticos regionales. *Id.* La subfase IIIA se caracteriza por metástasis peritoneal microscópica fuera de la pelvis y la subfase IIIB implica metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis de 2 cm o menos en su dimensión más grande. *Id.* La subfase IIIC es idéntica a IIIB, con la excepción de que la metástasis es mayor de 2 cm en su dimensión más grande y puede incluir metástasis de ganglios linfáticos regionales. *Id.* Por último, la Fase IV se refiere a la presencia de metástasis distante, excluyendo metástasis peritoneal. *Id.*

Aunque la determinación de fase quirúrgica es actualmente el punto de referencia para evaluar el manejo y

tratamiento del cáncer ovárico, la misma sufre de inconvenientes considerables, incluyendo la invasividad del procedimiento, el potencial de complicaciones así como el potencial de inexactitud. Moore, mencionado anteriormente en 206-208, 213. En vista de estas limitaciones, se ha puesto la atención en desarrollar metodologías de determinación de fase alternativas a través de la comprensión de la expresión génica diferencial en diversas fases del cáncer ovárico y mediante la obtención de diversos biomarcadores para ayudar a evaluar mejor la progresión de la enfermedad. Vartiainen, J. y col., *Int'l J. Cancer*, 95(5): 313-16 (2001); Shridhar y col. mencionado anteriormente; Baekelandt, M. y col., *J. Clin. Oncol.* 18 (22): 3775-81.

El tratamiento de cancer ovárico típicamente implica un ataque en varias direcciones, sirviendo la intervención quirúrgica como la base del tratamiento. Dennis S. Chi & William J. Hoskins, *Primary Surgical Management of Advanced Epithelial Ovarian Cancer*, en *Ovarian Cancer* 241 (Stephen C. Rubin & Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001). Por ejemplo, en el caso de cáncer ovárico epitelial, el cual representa el ~90% de casos de cáncer ovárico, el tratamiento consiste típicamente en: (1) cirugía citoreductora, incluyendo histerectomía total, salpingo-ooforectomía bilateral, omentectomía y linfadenectomía, seguido por (2) quimioterapia adyuvante con paclitaxel y cisplatino o carboplatino. Eltabbakh, G.H. & Awtrey, C.S., *Expert Op. Pharmacother.* 2(10): 109-24. A pesar del índice de respuesta clínica del 80% a la terapia con adyuvante, la mayoría de los pacientes experimenta reaparición tumoral dentro de los tres años del tratamiento. *Id.* Determinados pacientes se pueden someter a una segunda cirugía citoreductora y/o quimioterapia de segunda línea. Memarzadeh & Berek, mencionado anteriormente.

A partir de lo anterior, es evidente que los procedimientos usados para detectar, diagnosticar, supervisar, determinar la fase, pronosticar y prevenir la reaparición de cáncer ovárico son de importancia crítica para el resultado del paciente. Adicionalmente, los procedimientos actuales, aunque son útiles en cada uno de estos análisis, están limitados por su especificidad, sensibilidad, invasividad o su coste. Como tal, serían altamente deseables procedimientos altamente específicos y sensibles que pudieran funcionar a modo de detectar marcadores novedosos en células, tejidos o fluidos corporales, con invasividad mínima y a un coste razonable.

El cáncer mamario, también denominado cáncer de tumor mamario, es el segundo cáncer más común entre mujeres, representando una tercera parte de los cánceres diagnosticados en los Estados Unidos. Una de cada nueve mujeres desarrollará cáncer mamario en su vida y aproximadamente 192.000 casos nuevos de cáncer mamario se diagnostican anualmente con aproximadamente 42.000 muertes. Bevers, *Primary Prevention of Breast Cancer*, en *Breast Cancer*, 20-54 (Kelly K Hunt y col., ed., 2001); Kochanek y col., *49 Nat'l. Vital Statistics Reports* 1, 14 (2001). El cáncer mamario es extremadamente raro en mujeres menores de 20 años y es muy raro en mujeres menores de 30. La frecuencia de cáncer mamario aumenta con la edad y se hace significativa a los 50 años. Las mujeres no hispanas blancas tienen el índice de frecuencia más elevado de cáncer mamario y las mujeres coreanas tienen el más bajo. La frecuencia aumentada de las mutaciones genéticas de BRCA1 y BRCA2 que promueven cáncer mamario y otros cánceres se encuentran en Judíos Ashquenazí. Las mujeres afroamericanas tienen el índice de mortalidad más elevado de cáncer mamario entre estos mismos grupos (31 por 100.000), mientras que las mujeres chinas tienen el más bajo a 11 por 100.000. Aunque los hombres pueden tener cáncer mamario, esto es extremadamente raro (*American Cancer Society Website: cancer with the extension org of the world wide web*). Con la excepción de aquellos casos con factores genéticos asociados, las causas precisas de cáncer mamario no se conocen.

En el tratamiento de cáncer mamario, existe énfasis considerable en la detección y la evaluación de riesgos debido a que una determinación de fase temprana y precisa de cáncer mamario tiene un impacto significativo en la supervivencia. Por ejemplo, el cáncer mamario detectado en una fase temprana (fase T0, descrita más adelante) tiene un índice de supervivencia de cinco años del 92%. Por el contrario, si el cáncer no se detecta hasta una fase tardía (es decir, fase T4 (IV)), el índice de supervivencia de cinco años se reduce al 13%. *AJCC Cancer Staging Handbook* págs. 164-65 (Irvin D. Fleming y col. eds., 5ª ed. 1998). Algunas técnicas de detección, tales como mamografía y biopsia implican incomodidad aumentada, gastos y/o radiación, y únicamente se prescriben a pacientes con un riesgo elevado de cáncer mamario.

Los procedimientos actuales para pronosticar o detectar el riesgo de cáncer mamario no son óptimos. Un procedimiento para pronosticar el riesgo relativo de cáncer mamario es examinar los factores de riesgo del paciente y aplicar regímenes de diagnóstico y tratamiento agresivos para pacientes con riesgo elevado. El riesgo de un paciente de cáncer mamario se ha asociado positivamente con edad creciente, nuliparidad, historia familiar de cáncer mamario, historia personal de cáncer mamario, menarquía temprana, menopausia tardía, edad tardía de primer embarazo a término, enfermedad mamaria proliferativa anterior, radiación del seno en una fase temprana y una historia personal de malignidad. Los factores de estilo de vida tales como consumo de grasas, consumo de alcohol, educación y estado socioeconómico también se han asociado con una frecuencia aumentada de cáncer mamario aunque no se ha establecido una relación directa de causa y efecto. Aunque estos factores de riesgo son estadísticamente significativos, su asociación débil con el cáncer mamario ha limitado su utilidad. La mayoría de las mujeres que desarrollan cáncer mamario no tienen ninguno de los factores de riesgo enumerados anteriormente, aparte del riesgo que viene con el envejecimiento. *Publicación NIH N° 00-1556 (2000)*.

Los procedimientos de exploración actuales para detectar cáncer, tales como autoexamen mamario, ultrasonido y mamografía tienen desventajas que reducen su eficacia o evitan su adopción extendida. Los autoexámenes mamarios aunque son útiles no son fiables para la detección de cáncer en las fases iniciales en las que el tumor es

pequeño y difícil de detectar mediante la palpación. Las mediciones con ultrasonido requieren operarios expertos con un gasto aumentado. La mamografía, aunque es sensible, está sujeta a exceso de diagnóstico en la detección de lesiones que tienen potencial maligno cuestionable. También existe el miedo de la radiación usada en la mamografía ya que la radiación de tórax anterior es un factor asociado con una frecuencia aumentada de cáncer mamario.

En este momento, no existen procedimientos adecuados de prevención de cáncer mamario. Los procedimientos actuales de prevención de cáncer mamario implican mastectomía profiláctica (mastectomía realizada antes del diagnóstico de cáncer) y quimioprevención (quimioterapia antes del diagnóstico de cáncer), que son medidas drásticas que limitan su adopción incluso entre mujeres con un riesgo elevado de cáncer mamario. Bevers, mencionado anteriormente.

Varios marcadores genéticos se han asociado con el cáncer mamario. Los ejemplos de estos marcadores incluyen antígeno carcinoembrionario (CEA) (Mughal y col., JAMA 249: 1881 (1983)), MUC-1 (Frische y Liu, J. Clin. Ligand 22: 320 (2000)), HER-2/neu (Haris y col., Proc.Am.Soc.Clin.Oncology 15: A96 (1996)), uPA, PAI-1, LPA, LPC, RAK y BRCA (Esteva and Fritsche, Serum and Tissue Markers for Breast Cancer, en Breast Cancer, 286-308 (2001)). Estos marcadores tienen problemas con sensibilidad limitada, correlación baja y falsos negativos, que limitan su uso para el diagnóstico inicial. Por ejemplo, aunque la mutación del gen BRCA1 es útil como un indicador de un riesgo elevado de cáncer mamario, tiene un uso limitado en el diagnóstico de cáncer debido a que únicamente el 6,2% de los cánceres mamarios son positivos a BRCA1. Malone y col., JAMA 279: 922 (1998). Véase también, Mewman y col., JAMA 279: 915 (1998) (correlación de sólo el 3,3%).

Existen cuatro clasificaciones principales de cáncer mamario que varían de acuerdo con el sitio de origen y el alcance del desarrollo de la enfermedad.

I. Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): transformación maligna de las células epiteliales ductales que permanecen en su posición normal. El CDIS es una enfermedad puramente localizada, incapaz de metástasis.

II. Carcinoma ductal invasivo (CDI): malignidad de las células epiteliales ductales que emergen a través de la membrana basal y hacia el tejido de soporte del seno. El CDI se puede propagar eventualmente a cualquier sitio en el organismo.

III. Carcinoma lobular *in situ* (CLIS): malignidad que surge en un lóbulo único del seno que no se extiende a través de la pared lobular, generalmente permanece localizado.

IV. Carcinoma lobular infiltrante (CLI): malignidad que surge de un lóbulo único del seno y que invade directamente a través de la pared lobular a tejidos adyacentes. En virtud de su invasión más allá de la pared lobular, el CLI puede penetrar los vasos linfáticos y vasos sanguíneos y propagarse a sitios distantes.

Con el fin de determinar el pronóstico y tratamiento, estos cuatro tipos de cáncer mamario se han clasificado en fases de acuerdo al tamaño del tumor principal (T), la implicación de ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M). Aunque el CDIS por definición representa enfermedad de fase I localizada, las otras formas de cáncer mamario pueden variar desde fase II hasta fase IV. Existen factores de pronóstico adicionales que sirven además para guiar a la intervención quirúrgica y médica. Los más comunes son el número de ganglios linfáticos implicados, estado de RE (receptor de estrógeno), estado del receptor Her2/neu y grados histológicos.

Los cánceres mamarios se diagnostican en las categorías de fase apropiadas que reconocen que los tratamientos diferentes son más eficaces para fases diferentes de cáncer. La fase TX indica que el tumor primario no se puede evaluar (es decir, el tumor se eliminó o el tejido mamario se eliminó). La fase T0 se caracteriza por anomalías tales como hiperplasia pero sin evidencia de tumor primario. La etapa Tis se caracteriza por carcinoma *in situ*, carcinoma intraductal, carcinoma lobular *in situ* o enfermedad de Paget del pezón sin tumor. La fase T1 (I) se caracteriza como que tiene un tumor de 2 cm o menos en su dimensión más grande. Dentro de la fase T1, T1c indica microinvación de 0,1 cm o menos, T1a indica un tumor de entre 0,1 y 0,5 cm, T1b indica un tumor de entre 0,5 y 1 cm y T1c indica tumores de entre 1 cm y 2 cm. La fase T2 (II) se caracteriza por tumores de 2 cm a 5 cm en su dimensión más grande. Los tumores de un tamaño mayor de 5 cm se clasifican como fase T3 (III). La fase T4 (IV) indica un tumor de cualquier tamaño con extensión a la pared torácica o piel. Dentro de la fase T4, T4a indica extensión del tumor a la pared torácica, T4b indica edema o ulceración de la piel del seno o nódulos de piel satélite confinados al mismo seno, T4c indica una combinación de T4a y T4b y T4d indica carcinoma inflamatorio. AJCC Cancer Staging Handbook, págs. 159-70 (Irvin D. Fleming y col., eds., 5ª ed. 1998). Además de la determinación de fase convencional, los tumores mamarios se pueden clasificar de acuerdo con su estado del receptor de estrógeno y de la proteína del receptor de progesterona. Fisher y col, Breast Cancer Research and Treatment 7: 147 (1986). El estado patológico adicional, tal como el estado de HER2/neu también puede ser útil. Thor y col., J. Nat'l. Cancer Inst. 90: 1346 (1998); Paik y col., J. Nat'l. Cancer Inst. 90: 1361 (1998); Hutchins y col., Proc. Am. Soc. Clin. Oncology 17:A2 (1998); y Simpson y col., J.Clin.Oncology 18: 2059 (2000).

Además de la determinación de fase del tumor primario, las metástasis del cáncer mamario a ganglios linfáticos regionales se pueden clasificar en fases. La fase NX indica que los ganglios linfáticos no se pueden evaluar (por ejemplo, eliminados previamente). La fase N0 indica que no hay metástasis de ganglios linfáticos regionales. La fase N1 indica metástasis a ganglios linfáticos axilares ipsilaterales móviles. La fase N2 indica metástasis a ganglios

linfáticos axilares ipsilaterales fijados entre sí o a otras estructuras. La fase N3 indica metástasis a ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales. Id.

La determinación de fase tiene un valor de pronóstico potencial y proporciona criterios para diseñar la terapia óptima. Simpson y col., J. Clin. Oncology 18: 2059 (2000). En general, la determinación de fase patológica del cáncer mamario es preferible a la determinación de fase clínica debido a que la primera produce un pronóstico más preciso. Sin embargo, la determinación de fase clínica se preferiría si fuera tan precisa como la determinación de fase patológica debido a que la misma no depende de un procedimiento invasivo para obtener tejido para la evaluación patológica. La determinación de fase del cáncer mamario se podría mejorar detectando nuevos marcadores en células, tejidos o fluidos corporales que podrían diferenciar entre fases diferentes de invasión. El avance en este campo permitirá un procedimiento más rápido y fiable para tratar pacientes con cáncer mamario.

El tratamiento de cáncer mamario generalmente se decide después de una determinación de fase precisa del tumor primario. Las opciones de tratamiento primario incluyen terapia de conservación de seno (lumpectomía, radiación mamaria y determinación de fase quirúrgica de la axila) y mastectomía radical modificada. Los tratamientos adicionales incluyen quimioterapia, radiación regional y en los casos extremos, la eliminación de la producción de estrógenos mediante la ablación ovárica.

Hasta hace poco, el tratamiento habitual para todos los cánceres mamarios era la mastectomía. Fonseca y col., Annals of Internal Medicine 127: 1013 (1997). Sin embargo, los datos recientes indican que procedimientos menos radicales pueden ser igualmente eficaces, en términos de la supervivencia, para cáncer mamario de fase temprana. Fisher y col., J. of Clinical Oncology 16:441 (1998). Las opciones de tratamiento para un paciente con cáncer mamario de fase temprana (es decir, fase Tis) puede ser de cirugía conservadora de seno seguida por terapia de radiación localizada en el seno. Como alternativa, se puede emplear mastectomía opcionalmente acoplada con radiación o reconstrucción mamaria. Estos procedimientos de tratamiento son igualmente eficaces en las fases tempranas de cáncer mamario.

Los pacientes con cáncer mamario de fase I y fase II requieren cirugía con quimioterapia y/o terapia hormonal. La cirugía es de uso limitado en los pacientes en fase III y fase IV. Por lo tanto, estos pacientes son mejores candidatos para quimioterapia y terapia de radiación con cirugía limitada a biopsia para permitir la determinación de fase inicial o redeterminación de fase posterior debido a que el cáncer es raramente curativo en esta fase de la enfermedad. AJCC Cancer Staging manual 84. 164-65 (Irvin D. Fleming y col., 5ª ed. 1998).

En un esfuerzo para proporcionar más opciones de tratamiento a los pacientes, se están realizando esfuerzos para definir una fase más temprana de cáncer mamario con reaparición baja que se podría tratar con lumpectomía sin tratamiento de radiación postoperatorio. Aunque se ha realizado una serie de intentos para clasificar cáncer mamario de fase temprana, no se ha obtenido una recomendación de consenso acerca del tratamiento de radiación postoperatorio a partir de estos estudios. Page y col., Cancer 75:1219 (1995); Fisher y col., Cancer 75:1223 (1995); Silverstein y col., Cancer 77:2267 (1996).

El documento WO 02/06317 divulga composiciones y procedimientos para la terapia y diagnóstico de cáncer, tal como cáncer ovárico. Tales composiciones pueden comprender una o más proteínas de carcinoma ovárico, partes inmunogénicas de la misma, polinucleótidos que codifican tales partes o anticuerpos o células del sistema inmune específicas para tales proteínas.

Como se ha descrito anteriormente, cada uno de los procedimientos para diagnosticar y determinar la fase de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario está limitado por la tecnología empleada. Por consiguiente, existe la necesidad de marcadores moleculares y celulares sensibles para la detección de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario. Existe una necesidad de marcadores moleculares para la determinación de fase precisa, incluyendo determinación de fase clínica y patológica, de cánceres ovárico, pancreático, de pulmón o mamario para optimizar los procedimientos de tratamiento. Finalmente, existe una necesidad de marcadores moleculares y celulares sensibles para supervisar el progreso de tratamientos de cáncer, incluyendo marcadores que puedan detectar la reaparición de cánceres ovárico, pancreático, de pulmón o mamario a continuación de remisión.

La presente invención proporciona procedimientos alternativos para tratar cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario que superan las limitaciones de los procedimientos terapéuticos convencionales así como también ofrece ventajas adicionales que serán evidentes a partir de la descripción detallada más adelante.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo Ovr110 aislado como se define por las reivindicaciones que se une a Ovr110 en una célula de mamífero *in vivo*, en el que dicho anticuerpo se internaliza tras la unión a Ovr110 en una célula de mamífero *in vivo*. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. Como alternativa, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo quimérico o humanizado. El anticuerpo monoclonal de la invención se produce mediante un hibridoma seleccionado entre el grupo de hibridomas depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de acceso PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856 y PTA-5884.

Como alternativa, el anticuerpo de la invención compite para unirse al mismo epítipo que el epítipo unido por el

anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo de hibridomas depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo con los números de acceso PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856 y PTA-5884.

5 La invención también se refiere a anticuerpos conjugados de acuerdo con las reivindicaciones. Los mismos se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o a un agente citotóxico. El agente citotóxico se puede seleccionar entre el grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas y toxinas. Los ejemplos de toxinas incluyen, pero sin limitación, maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina o caliqueamicina.

10 La célula de mamífero a la que se une el anticuerpo de la invención es una célula de cáncer que expresa Ovr110. Preferentemente, el anticuerpo monoclonal anti-Ovr110 inhibe el crecimiento de células que expresan Ovr110 *in vivo*.

El anticuerpo se puede producir en bacterias. Como alternativa, el anticuerpo puede ser una forma humanizada de un anticuerpo anti-Ovr110 producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo de hibridomas que tienen el número de acceso de ATCC PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856 y PTA-5884.

15 Preferentemente, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer ovárico, pancreático, de pulmón y mamario. La invención también se refiere a un procedimiento para producir los anticuerpos que comprenden cultivar una célula apropiada y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones y un vehículo. El anticuerpo puede estar conjugado a un agente citotóxico. El agente citotóxico puede ser un isótopo radiactivo u otro agente quimioterapéutico.

20 La invención también se refiere a los anticuerpos de la presente invención para uso en la destrucción de una célula de cáncer que expresa Ovr110 de acuerdo con las reivindicaciones. La célula de cáncer se puede seleccionar entre el grupo que consiste en célula de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón y mamario.

25 El cáncer ovárico o mamario puede ser adenocarcinoma seroso ovárico o carcinoma ductal infiltrante mamario o cáncer metastásico. El cáncer mamario puede ser cáncer mamario negativo a HER-2. La invención también se refiere a una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en el alivio de un cáncer que expresa Ovr110 en un mamífero.

30 Adicionalmente, se describe un artículo de preparación que comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo como se ha definido por las reivindicaciones. El artículo de preparación también puede comprender un componente adicional, por ejemplo, un prospecto que indica que la composición se puede usar para tratar cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario.

Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 muestra los resultados de análisis FACS de células LMTK de ratón transfectadas con Ovr110.
 La FIGURA 2 muestra inmunofluorescencia con Ovr110-A57.1 en células de cáncer ovárico y mamario vivas.
 35 La FIGURA 3 muestra unión e internalización de Ovr110-A57.1 en células de cáncer ovárico y mamario vivas.
 La FIGURA 4 muestra inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma seroso ovárico.
 La FIGURA 5 muestra inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma ductal infiltrante mamario.
 40 La FIGURA 6 muestra inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma de páncreas.
 La FIGURA 7: A-F muestra expresión de miembros de la familia B7 el día 3 en células T FITC CD3 estimuladas con PHA separadas y; G-I muestra unión de proteína de fusión BTLA-Fc a células Ovr110-293F.
 La FIGURA 8 A-C muestra detección mediante transferencia de Western de proteína Ovr110 con mAb A57.1 en líneas celulares y tejidos de tumor humanos.
 45 La FIGURA 9 muestra que la proteína Ovr110 no se detecta en extractos de órganos principales.
 La FIGURA 10 muestra silenciamiento específico de ARNm de Ovr110 en células de cáncer mamario SKBR3.
 La FIGURA 11 muestra regulación negativa de proteína Ovr110 mediante ARNs en células SKBR3.
 50 La FIGURA 12 muestra que el silenciamiento de ARNm de Ovr110 induce apoptosis en células SKBR3.
 La FIGURA 13 muestra que el silenciamiento de ARNm de Ovr110 induce actividad de caspasa en células SKBR3.
 La FIGURA 14 muestra que la sobreexpresión de Ovr110 potencia el crecimiento del xenoinjerto de tumor.
 La FIGURA 15 muestra que la sobreexpresión de Ovr110 protege de la apoptosis.
 55 La FIGURA 16 muestra el mapa de epítipo de Ovr110 para los diferentes anticuerpos.
 La FIGURA 17 muestra la detección de Ovr110 en suero de donantes sanos y pacientes con cáncer.
 La FIGURA 18 muestra detección de Ovr110 en diferentes tipos de cáncer ovárico y muestras de enfermedad benigna.

La FIGURA 19 muestra las curvas de Característica Operativa del Receptor (COR) para detectar Ovr110.

Descripción detallada de la invención

Definiciones y técnicas generales

“Ovr110” humano como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de 282 aminoácidos que se expresa en la superficie celular como glicoproteína, cuya secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos son como se divulgan en, por ejemplo, el documento WO 00/12758, gen específico de cáncer (CSG) Ovr110; el documento WO 99/63088, proteína unida a membrana PRO1291; el documento WO00/36107, antígeno de carcinoma ovárico humano; el documento WO 02/02624-A2 proteína similar a B7 humana (B7-L); el documento WO 02/06317 (0E8). Los aminoácidos 30-282 están presumiblemente en la superficie celular. Ovr110 como se usa en el presente documento incluye variantes alélicas y mutantes de sustitución conservativa de la proteína, que tienen actividad biológica de Ovr110.

Recientemente, una serie de tres publicaciones independientes ha identificado Ovr110 en ratón y ser humano como un miembro nuevo de la familia B7 de células T de moléculas co-estimuladoras, una clase importante de moléculas que regulan muy estrictamente la activación/inhibición de la función de células T. Prasad y col., B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation, *Immunity* 18: 863-73 (2003); Sica y col., B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity, *Immunity* 18: 849-61 (2003); y Zang y col., B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation, *Proc. Natl Acad. Sci EE.UU.* 100: 10388-92 (2003). La secuencia de aminoácidos pronosticada del gen de ratón para B7S 1 (Prasad 2003) era altamente homóloga a la molécula de Ovr110 identificada previamente y la secuencia pronosticada de las moléculas de B7-H4/B7x humanas (Sica 2003; Zang 2003) eran idénticas a Ovr110. El análisis inmunofluorescente indirecto mediante citometría de flujo confirmó adicionalmente la unión de los anticuerpos monoclonales de Ovr110 a poblaciones de linfocitos T activados, como se ha descrito por estos autores.

Los hallazgos de los inventores con respecto a que Ovr110 está limitado aparentemente a los cánceres ováricos y mamarios más agresivos hacen que este antígeno de superficie celular sea una diana atractiva para inmunoterapia de estos y posiblemente otros tipos de tumor.

El término “anticuerpos” (Ab) como se usa en el presente documento incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre y cuando los mismos muestren la actividad biológica deseada. El término “inmunoglobulina” (Ig) se usa de manera intercambiable con “anticuerpo” en el presente documento.

Un “anticuerpo aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. Preferentemente, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso de anticuerpo determinado mediante el método de Lowry y más preferentemente más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, por lo general el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H) (un anticuerpo IgM consiste en 5 de la unidad heterotetramérica básica junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y por lo tanto contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas junto con la cadena J). En el caso de IgG, la unidad de 4 cadenas generalmente es de aproximadamente 150.000 Dalton. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un puente de disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más puentes de disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tienen puentes de disulfuro intracadena separados de manera regular. Cada cadena H tiene en el extremo N un dominio variable (VH) seguido por tres dominios constantes (CH) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios CH para los isotipos lambda y kappa. Cada 6 cadenas L tienen en el extremo N un dominio variable (VL) seguido por un dominio constante (CL) en su otro extremo.

El VL está alineado con el VH y el CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (CHI).

Se cree que los restos de aminoácido particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El apareamiento de una VH y VL entre sí forma un sitio de unión a antígeno único. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Teff y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrados se puede asignar a uno de dos tipos claramente diferentes, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácido de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en base a diferencias relativamente secundarias en la secuencia y función de C_H , por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren de forma extensa en secuencia entre anticuerpos. El dominio V media la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida de forma uniforme a través del tramo de los aminoácidos 1-10 de los dominios variables. En lugar de ello, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones flanqueantes (RF) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de largo. Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas cada uno comprende cuatro RF, adoptando en su mayoría una configuración de lámina P, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina P. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana mediante las RF y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de aproximadamente los restos 24-34 (L1), 5056 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y alrededor de aproximadamente 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (113) en la VH; Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (U) en la VL y 26-32 (H1), 53-55 (1-12) y 96-101 (H3) en la VH; Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)).

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a través de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose a un sitio antigénico único. Además, al contrario de las preparaciones de anticuerpo policlonal, que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige a un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son provechosos en el sentido de que los mismos se pueden sintetizar de forma no contaminada por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no se debe interpretar como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden preparar mediante la metodología de hibridoma descrita en primer lugar por Kohler y col., *Nature*, 256-495 (1975), o se pueden preparar usando procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas animales o vegetales (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpo de fago usando las técnicas descritas en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos a partir de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico a u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos a partir de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando los mismos muestren la actividad biológica deseada (véase la Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable obtenidas a partir de un primate no humano (mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humana.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno así como una CL y al menos dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o una variante de secuencia de aminoácidos del mismo. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab',

F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la Patente de los Estados Unidos N° 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata y col., Proteon Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, una denominación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de región variable de la cadena H (VH) y el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a unión a antígeno, es decir, el mismo tiene un sitio de unión a antígeno único. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un fragmento F(ab')₂ grande único que corresponde a aproximadamente dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y que es capaz de entrecruzamiento a antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que tienen pocos restos adicionales en el extremo carboxi del dominio CH1 incluyendo una o más cisteínas a partir de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento de Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de 8 fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre los mismos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las partes carboxi terminales de ambas cadenas H unidas entre sí mediante disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante secuencias en la región Fc, región que también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) encontrados en determinados tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y ligera en asociación estrecha no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que contribuyen a la unión a antígeno de restos de aminoácido y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque a una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

"Fv de cadena única" también abreviado "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL conectados en una cadena polipeptídica única. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un engarce polipeptídico entre los dominios VH y VL que posibilita que sFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, mencionado más adelante.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con engarces cortos (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios VH y VL de forma que se consigue el emparejamiento inter-cadena pero no intra-cadena de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "de cruce" en los que los dominios VH y VL de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90: 6444-6448 (1993).

Un polipéptido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por ejemplo, anticuerpos) obtenido de la naturaleza. Tales polipéptidos de secuencia nativa se pueden aislar a partir de la naturaleza o se pueden producir mediante medios recombinantes o sintéticos. Por tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido humano de origen natural, un polipéptido murino o un polipéptido de cualquier otra especie de mamífero.

La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a un polipéptido que tiene las secuencias de aminoácidos que difieren en algún grado del polipéptido de secuencia nativa. Por lo general, las variantes de secuencia de aminoácidos de Ovr110 poseerán al menos aproximadamente el 70% de homología con la secuencia nativa Over110, preferentemente, al menos aproximadamente el 80%, más preferentemente al menos aproximadamente el 85%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 90% de homología y lo más preferente es que sea de al menos el 95%. Las variantes de secuencia de aminoácidos pueden poseer sustituciones, supresiones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.

La expresión "fragmento funcional o análogo" de un anticuerpo es un compuesto que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo anti-IgE es uno que se puede unir a una inmunoglobulina IgE de una manera tal de evitar o reducir sustancialmente la capacidad de tal molécula de tener la capacidad de unirse al receptor de afinidad elevada, FcεRI.

"Homología" se define como el porcentaje de restos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje máximo de homología. Los procedimientos y programas informáticos para el alineamiento se conocen bien en la técnica. La

similitud de secuencia se puede medir mediante cualquier algoritmo de análisis de secuencia común, tal como GAP o BESTFIT u otro alineamiento de variación de Smith-Waterman véase, T. F. Smith y M. S. Waterman, J. Mol. Biol. 147: 195-197 (1981) y W.R. Pearson, Genomics 11: 635-650 (1991).

5 Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima obtenida a partir del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseada. En algunos casos, los restos de región flanqueante (RF) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por
10 restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo o al menos uno y típicamente dos, dominios variables, en los que todo o sustancialmente todo el bucle hipervariable corresponde al de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las RF
15 son de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones y col., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

20 Como se usa en el presente documento, un anticuerpo anti-Ovr110 que se "internaliza" es uno que es captado por (es decir, entra en) la célula tras la unión a Ovr110 en una célula de mamífero (es decir, Ovr110 de superficie celular). El anticuerpo internalizante, por supuesto incluirá fragmentos de anticuerpo, anticuerpo humano o humanizado y conjugado de anticuerpo. Para aplicaciones terapéuticas, se contempla la internalización *in vivo*. El número de moléculas de anticuerpo internalizadas será suficiente o adecuado para destruir una célula que expresa Ovr110, especialmente una célula de cáncer que expresa Ovr110. Dependiendo de la potencia del anticuerpo o
25 conjugado de anticuerpo, en algunos casos, la captación de una molécula de anticuerpo única en la célula es suficiente para destruir la célula diana a la que se une el anticuerpo. Por ejemplo, determinadas toxinas son altamente potentes en la destrucción de forma que la internalización de una molécula de la toxina conjugada al anticuerpo es suficiente para destruir la célula tumoral.

30 Si un anticuerpo anti-Ovr110 se ha internalizado tras la unión a Ovr110 sobre una célula de mamífero se puede determinar mediante diversos ensayos que incluyen aquellos descritos en los ejemplos experimentales más adelante. Por ejemplo, para ensayar la internalización *in vivo*, el anticuerpo de ensayo se marca y se introduce en un animal que se sabe que tiene Ovr110 expresado en la superficie de determinadas células. El anticuerpo se puede marcar radiactivamente o marcar con partículas fluorescentes o de oro, por ejemplo. Los animales adecuados para este ensayo incluyen un mamífero tal como un ratón desnudo NCR que contiene un trasplante o xenoinjerto de
35 tumor que expresa Ovr110 humano o un ratón en el que se han introducido células transfectadas con Ovr110 humano o un ratón transgénico que expresa el transgén de Ovr110 humano. Los controles apropiados incluyen animales que no recibieron el anticuerpo de ensayo o que recibieron un anticuerpo no relacionado y animales que recibieron un anticuerpo a otro antígeno en las células de interés, anticuerpo que se conoce que se internaliza tras la unión al antígeno. El anticuerpo se puede administrar al animal, por ejemplo, mediante inyección intravenosa. En intervalos de tiempo adecuados, se pueden preparar cortes de tejido del animal usando procedimientos conocidos o como se ha descrito en los ejemplos experimentales más adelante y analizarse mediante microscopía de luz o microscopía electrónica, para determinar la internalización así como también la localización del anticuerpo
40 internalizado en la célula. Para internalización *in vitro*, las células se puede incubar en placas de cultivo de tejido en presencia o ausencia de los anticuerpos pertinentes añadidos al medio de cultivo y procesarse para análisis microscópico en puntos de tiempo deseados. La presencia de un anticuerpo internalizado y marcado en las células se puede visualizar directamente mediante microscopía o mediante auto-radiografía si se usa un anticuerpo marcado radiactivamente. Como alternativa, en un ensayo bioquímico cuantitativo, una población de células que comprende células que expresan Ovr110 se pone en contacto *in vitro* o *in vivo* con un anticuerpo de ensayo
45 marcado radiactivamente y las células (si se ponen en contacto *in vivo*, las células entonces se aíslan después de una cantidad de tiempo adecuada) se tratan con una proteasa o se someten a un lavado ácido para eliminar el anticuerpo no internalizado de la superficie de la célula. Las células se triturar y la cantidad de recuentos resistentes a proteasa radiactivos por minuto (cpm) asociados con cada lote de células se mide haciendo pasar el homogenado a través de un contador de centelleo. En base a la actividad específica conocida del anticuerpo marcado radiactivamente, se puede deducir el número de moléculas de anticuerpo internalizadas por célula a partir de los
50 recuentos de centelleo de las células trituradas. Las células se "ponen en contacto" con un anticuerpo *in vitro* preferentemente en forma de solución tal como añadiendo las células al medio de cultivo celular en la placa de cultivo o matraz y mezclando el anticuerpo bien con el medio para asegurar la exposición uniforme de las células al anticuerpo. En lugar de añadirse al medio de cultivo, las células se pueden poner en contacto con el anticuerpo de ensayo en una solución isotónica tal como PBS en un tubo de ensayo durante el período de tiempo deseado. *In vivo*,
55 las células se ponen en contacto con anticuerpos mediante cualquier procedimiento adecuado de administración del anticuerpo de ensayo tales como los procedimientos de administración descritos más adelante cuando se administran a un paciente.

Cuanto más rápida sea la velocidad de internalización del anticuerpo tras la unión a la célula que expresa Ovr110 *in*

vivo, será más rápida la destrucción deseada o el efecto inhibitor del crecimiento sobre la célula que expresa Ovr110 que se puede conseguir, por ejemplo, mediante un inmunoconjugado citotóxico. Preferentemente, la cinética de internalización de los anticuerpos anti-Ovr110 es tal que la misma favorece la destrucción rápida de la célula diana que expresa Ovr110. Por lo tanto, es deseable que el anticuerpo anti-Ovr110 muestre una velocidad de internalización rápida preferentemente, dentro de 24 horas a partir de la administración del anticuerpo *in vivo*, más preferentemente dentro de aproximadamente 12 horas, aún más preferentemente dentro de aproximadamente 30 minutos a 1 hora y lo más preferente es que sea dentro de aproximadamente 30 minutos. La presente invención proporciona anticuerpos que se internalizan tan rápido como aproximadamente 15 minutos a partir del tiempo de introducción del anticuerpo anti-Ovr110 *in vivo*. El anticuerpo preferentemente se internalizará en la célula dentro de unas pocas horas tras la unión a Ovr110 en la superficie celular, preferentemente dentro de una hora, aún más preferentemente dentro de 15-30 minutos.

Para determinar si un anticuerpo de ensayo puede competir por la unión al mismo epítipo que el epítipo unido mediante los anticuerpos anti-Ovr110 de la presente invención incluyendo los anticuerpos producidos mediante los hibridomas depositados en la ATCC, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado, por ejemplo, un ELISA competitivo. En un ensayo de ELISA competitivo ilustrativo, pocillos revestidos con Ovr110 de una placa de microtitulación o perlas de sefarosa revestidas con Ovr110, se incuban previamente con o sin anticuerpo de competencia candidato y después se añade un anticuerpo anti-Ovr110 marcado con biotina de la invención. La cantidad de anticuerpo anti-Ovr110 unido al antígeno de Ovr110 en los pocillos o en las perlas se mide usando conjugado de avidina-peroxidasa y sustrato apropiado.

Como alternativa, el anticuerpo anti-Ovr110 se puede marcar, por ejemplo, con un marcador radiactivo o fluorescente o algún otro marcador detectable y medible. La cantidad de anticuerpo anti-Ovr110 que se une al antígeno tendrá una correlación inversa con la capacidad del anticuerpo competidor candidato (anticuerpo de ensayo) de competir por la unión al mismo epítipo en el antígeno, es decir, cuanto mayor sea la afinidad del anticuerpo de ensayo por el mismo epítipo, menos anticuerpo anti-Ovr110 marcado se unirá a los pocillos revestidos con antígeno. Un anticuerpo competidor candidato se considera un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o que compite por la unión al mismo epítipo que un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención si el anticuerpo competidor candidato puede bloquear la unión del anticuerpo anti-Ovr110 en al menos el 20%, preferentemente en al menos el 20-50%, aún más preferentemente, en al menos el 50% en comparación con un control realizado en paralelo en ausencia del anticuerpo competidor candidato (pero puede ser en presencia de un anticuerpo no competidor conocido). Se apreciará que se pueden realizar variaciones de este ensayo para llegar al mismo valor cuantitativo.

Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo designado, tal como cualquiera de los anticuerpos monoclonales Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (identificado previamente como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A 99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1., Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1 y Ovr110.C17.1, es uno que posee una o más de las características biológicas de aquel anticuerpo que lo distingue de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno, Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (identificado previamente como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A 99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1., Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1 y Ovr110.C17.1 se unirá al mismo epítipo al que se une Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (identificado previamente como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A 99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1., Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1 y Ovr110.C17.1 (por ejemplo, que compite por unión o bloques que se unen a anticuerpo monoclonal Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (identificado previamente como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A 99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1., Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1 y Ovr110.C17.1 a Ovr110), es capaz de dirigirse a una célula de tumor que expresa Ovr110 *in vivo* y se internalizará tras la unión a Ovr110 en una célula de mamífero *in vivo*. Análogamente, un anticuerpo con la característica biológica del Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (identificado previamente como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A 99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1., Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1 y anticuerpo Ovr110.C17.1 tendrá las mismas propiedades de unión a epítipo, dirección, internalización, inhibitoras del crecimiento tumoral y citotóxica del anticuerpo.

El término anticuerpo "antagonista" se usa en el sentido más amplio e incluye un anticuerpo que bloquea, inhibe o neutraliza parcialmente o completamente una actividad biológica de una proteína Ovr110 nativa divulgada en el presente documento. Los procedimientos para identificar antagonistas de un polipéptido Ovr110 pueden comprender

poner en contacto un polipéptido Ovr110 o una célula que expresa Ovr110 en la superficie de la célula, con un anticuerpo antagonista candidato y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido Ovr110.

5 Un "anticuerpo que inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan Ovr110" o un anticuerpo "inhibidor del crecimiento" es uno que se une a y da como resultado la inhibición del crecimiento medible de células de cáncer que expresan o sobreexpresan Ovr110. Los anticuerpos anti-Ovr110 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células de tumor que expresan Ovr110, por ejemplo, células de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario, en más del 20%, preferentemente de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 50% y aún más preferentemente, en más del 50% (por ejemplo, desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 100%) en comparación con el control apropiado, siendo el control típicamente células de tumor no tratadas con el anticuerpo que se está ensayando. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 pg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células de tumor al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de células de tumor *in vivo* se puede determinar de diversas maneras tal como se describe en la sección de Ejemplos Experimentales más adelante. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-Ovr110 de aproximadamente 1 pg/kg a aproximadamente 100 pg/kg de peso corporal da como resultado la reducción del tamaño del tumor o de la proliferación de células de tumor dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

20 Un anticuerpo que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada determinada mediante la unión de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos). La célula habitualmente es una que sobreexpresa Ovr110. Preferentemente la célula es una célula de tumor, por ejemplo, una célula ovárica, pancreática, pulmonar o mamaria. Diversos procedimientos están disponibles para evaluar los acontecimientos celulares asociados con apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la traslocación de fosfatidil serina (PS) mediante la unión de anexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través de la formación de escalonamiento de ADN y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación de ADN se puede evaluar mediante cualquier aumento en las células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que da como resultado aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente aproximadamente 5 a 50 veces y más preferentemente aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión a anexina con relación a células no tratadas en un ensayo de unión a anexina.

35 Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varía con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B) y activación de células B.

40 "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida en receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta antígeno y posteriormente destruya a la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para tal destrucción. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan únicamente Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de los Estados Unidos N° 5.500.362 ó 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se divulga en Clynes y col. PNAS (EE.UU.) 95: 652-656 (1998).

55 "Receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Habitualmente, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor γ) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativas de estos receptores. Los receptores de Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunoreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase la revisión M. en Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos que se identificarán en el futuro, están abarcados por el término "FcR" en el presente

documento. El término también incluye el término receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim y col., J. Immunol. 24: 249 (1994)).

5 Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMC y NK. Las células efectoras se pueden aislar a partir de una fuente nativa, por ejemplo, a partir de sangre.

10 "Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en la presencia de complemento. La activación de la ruta de complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen a su antígeno homólogo. Para evaluar la activación de complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

15 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o malignidades linfoides. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer pulmonar incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal
20 incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer mamario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de células B, cerebro, así como cáncer de cabeza y cuello y metástasis asociadas.

25 Una "célula que expresa Ovr110" es una célula que expresa Ovr110 endógena o transfectada en la superficie de la célula. Un "cáncer que expresa Ovr110" es un cáncer que comprende células que tienen proteína Ovr110 presente en la superficie de la célula. Un "cáncer que expresa Ovr110" produce niveles suficientes de Ovr110 en la superficie de las células del mismo, de forma que un anticuerpo anti-Ovr110 se puede unir a las mismas y tiene un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Un cáncer que "sobre expresa" Ovr110 es un que tiene niveles significativamente
30 elevados de Ovr110 en la superficie de la célula del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Tal sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o por la transcripción o traducción aumentada. La sobreexpresión de Ovr110 se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de niveles aumentados de la proteína Ovr110 presente en la superficie de una célula (por ejemplo, a través de un ensayo de inmunohistoquímica; análisis FACS). Como alternativa o adicionalmente, se pueden medir
35 los niveles de ácido nucleico o ARNm que codifica Ovr110 en la célula, por ejemplo, a través de hibridación *in situ* fluorescente; (FISH; véase el documento W098/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de Southern, transferencia de Northern o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión de Ovr110 midiendo el antígeno desprendido en un fluido biológico tal como suero, por ejemplo, usando ensayos basados en anticuerpo (véase también, por
40 ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 4.933.294 expedida el 12 de junio de 1990; el documento W091/05264 publicado el 18 de abril de 1991; la Patente de los Estados Unidos 5.401.638 expedida el 28 de marzo de 1995; y Sias y col. J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, están disponibles diversos ensayos *in vivo* para el facultativo experto. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está marcado opcionalmente con un marcador detectable, por ejemplo un isótopo radiactivo y se
45 puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, por ejemplo, mediante exploración externa para determinar radiactividad o mediante el análisis de una biopsia tomada a partir de un paciente expuesto previamente al anticuerpo. Un cáncer que expresa Ovr110 incluye cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario.

50 Un "mamífero" con los fines de tratar un cáncer o aliviar los síntomas de cáncer se refiere a cualquier mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y de zoológico, deportivos o mascotas tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc.. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico al que se dirige. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos propensos a
55 tener el trastorno o a aquellos en los que el trastorno se tiene que prevenir. Un sujeto o mamífero se "trata" satisfactoriamente para un cáncer que expresa Ovr110 si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-Ovr110 de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable o medible en o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células de cáncer o ausencia de células de cáncer; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización hasta
60 algún grado y preferentemente parada) de infiltración de células de cáncer en órganos periféricos incluyendo la propagación de cáncer en tejido blando y hueso; inhibición (ralentización en algún grado y preferentemente parada)

de metástasis tumoral; inhibición hasta algún grado, de crecimiento tumoral; y/o alivio hasta algún grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas y mejora en la calidad de vida. De acuerdo con el alcance en el que el anticuerpo anti-Ovr110 puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células de cáncer existentes, puede ser citostático o citotóxico. La reducción de estos signos o síntomas también puede sentirla el paciente.

Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejora en la enfermedad se pueden medir fácilmente mediante procedimientos de rutina familiares a un médico. Para la terapia de cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo de la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando el índice de respuesta (IR).

La expresión cantidad “terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo o un fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células de cáncer; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir ralentizar hasta algún grado y preferentemente detener) la infiltración de células de cáncer en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta algún grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir hasta algún grado el crecimiento tumoral y/o aliviar hasta algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición precedente de “tratar”. De acuerdo con el grado en el que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células de cáncer existentes, puede ser citostático y/o citotóxico.

Administración “crónica” se refiere a la administración del agente o agentes en un modo continuo a diferencia de un modo agudo, de forma de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo prolongado.

Administración “intermitente” es un tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino más bien es de naturaleza cíclica.

Administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

“Vehículos” como se usa en el presente documento incluye vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero que se está exponiendo a los mismos y en las concentraciones empleadas.

Con frecuencia el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptable incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulina; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, polietilén glicol (PEG) y PLURONICSTM.

La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término tiene por objeto incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercalables, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, por ejemplo, gelonina, ricina, saporina y los diversos agentes antitumorales o anticáncer divulgados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida provoca la destrucción de las células tumorales.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula de cáncer que expresa Ovr110, *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan Ovr110 en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente a la fase S), tales como los agentes que inducen parada de G1 y parada de fase M. Los bloqueantes de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y Israel, eds., capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami y col (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticáncer ambos obtenidos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), obtenido del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel

promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo cual da como resultado la inhibición de mitosis en las células.

“Marcador” como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directamente o indirectamente con el anticuerpo de forma de generar un anticuerpo “marcado”. El marcador se puede detectar por sí mismo (por ejemplo, marcadores radiactivos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

La expresión “epítipo etiquetado” usada en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-Ovr110 fusionado a un “polipéptido marcador”. El polipéptido marcador tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo frente al cual se puede preparar un anticuerpo, aunque es lo suficientemente corto de forma que no interfiere con la actividad del polipéptido de Ig al cual está fusionado. El polipéptido marcador también es preferentemente bastante singular para que el anticuerpo no reaccione de forma cruzada sustancialmente con otros epítopos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos seis restos de aminoácido y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácido (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácido).

Una “molécula pequeña” se define en el presente documento que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

El término “prospecto” se usa para referirse a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias con referencia al uso de tales productos terapéuticos.

Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, ADN o un polímero mezclado, que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN genómico así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan naturalmente a una secuencia nativa. La expresión abarca una molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su entorno de origen natural e incluye aislados de ADN recombinante o clonado y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente mediante sistemas heterólogos. Una molécula de ácido nucleico sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula de ácido nucleico.

“Vector” incluye vectores lanzadera y de expresión e incluye, por ejemplo, un plásmido, cósmido o fagémido. Típicamente, una construcción de plásmido también incluirá un origen de replicación (por ejemplo, el origen de replicación ColE1) y un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a ampicilina o tetraciclina), para la replicación y selección, respectivamente, de los plásmidos en las bacterias. Un “vector de expresión” se refiere a un vector que contiene las secuencias de control o los elementos reguladores necesarios para la expresión de los anticuerpos incluyendo fragmentos de anticuerpo de la invención, en células procariontas, por ejemplo, bacterianas o eucariotas. Los vectores adecuados se describen más adelante.

La célula que produce un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención incluirá la célula de hibridoma parental, por ejemplo, los hibridomas que están depositados en la ATCC, así como células huésped bacterianas y eucariotas en las que se ha introducido el ácido nucleico que codifica los anticuerpos. Las células huésped adecuadas se describen más adelante.

Interferencia de ARN se refiere al procedimiento de silenciamiento génico post transcripcional específico de secuencia en animales mediado por ARN de interferencia cortos (ARNsi) (Fire y col., 1998, Nature, 391, 806). El procedimiento correspondiente en plantas comúnmente se denomina silenciamiento génico post transcripcional o silenciamiento de ARN y también se denomina extinción en hongos. El procedimiento de silenciamiento génico post transcripcional se cree que es un mecanismo de defensa celular conservado de manera evolutiva usado para evitar la expresión de genes ajenos que se comparten comúnmente por flora y filos diversos (Fire y col., 1999, Trends Genet, 15, 358). Tal protección de la expresión de genes ajenos puede haber evolucionado como respuesta a la producción de ARN bicatenarios obtenidos a partir de infección viral o la integración aleatoria de elementos de transposón en un genoma huésped a través de la respuesta celular que destruye específicamente ARN monocatenario homólogo o ARN genómico viral. La presencia de ARNs en células desencadena la respuesta de iARN a través de un mecanismo que aún tiene que ser caracterizado completamente. Este mecanismo parece ser diferente de la respuesta de interferón que se produce como resultado de la activación mediada por ARNs de PKR proteína quinasa y 2',5'-oligoadenilato sintetasa dando como resultado la escisión inespecífica de ARNm por ribonucleasa L.

La presencia de ARNs largos en células estimula la actividad de la enzima ribonucleasa III denominada Dicer. Dicer está implicada en el procesamiento de los ARNs en trozos cortos de ARNs conocidos como ARN de interferencia corto (ARNsi) (Berstein y col., 2001, Nature, 409, 363). Los ARN de interferencia cortos obtenidos a partir de la actividad de Dicer tienen típicamente aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud y comprenden aproximadamente 19 dúplex de pares de bases. Dicer también ha estado implicada en la escisión de ARN temporal pequeño de 21 y 22 nucleótidos (ARNst) a partir de ARN precursores de estructura conservada que están

implicados en el control traduccional (Hutvagner y col., 2001, Science, 293, 834). La respuesta de iARN también presenta un complejo de endonucleasa que contiene un ARNsi, denominado comúnmente un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media la escisión de ARN monocatenario que tiene secuencia complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNsi. La escisión del ARN diana tiene lugar en el medio de la región complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNsi (Elbashir y col., 2001, Genes Dev., 15, 188).

La iARN mediada por ARN de interferencia cortos se ha estudiado en una diversidad de sistemas. Fire y col., 1998, Nature, 391, 806, fueron los primeros en observar iARN en *C. Elegans*. Wianny y Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70, describen iARN mediada por ARNs en embriones de ratón. Hammond y col., 2000, Nature, 404, 293, describen iARN en células de *Drosophila* transfectadas con ARNs. Elbashir y col., 2001, Nature, 411, 494, describen iARN inducida por introducción de dúplex de ARN de 21 nucleótidos sintéticos en células de mamífero cultivadas incluyendo células de riñón embrionario humano y HeLa. Trabajos recientes en lisados embrionarios de *Drosophila* (Elbashir y col., 2001, EMBO J., 20, 6877) han revelado determinados requerimientos de la longitud, estructura, composición química y secuencia del ARNsi que son esenciales para mediar la actividad de iARN eficaz. Estos estudios han demostrado que los dúplex de ARNsi de 21 nucleótidos son más activos cuando contienen dos salientes 3' nucleotídicos. Además, la sustitución completa de una o ambas hebras de ARNsi con nucleótidos 2'-desoxi (2'-H) o 2'-O-metilo anula la actividad de iARN, mientras que la sustitución de los salientes nucleotídicos de ARNsi 3' terminal con desoxi nucleótidos (2'-H) demostró ser tolerada. Secuencias no coincidentes únicas en el centro del dúplex de ARNsi también demostraron anular la actividad de iARN. Adicionalmente, estos estudios también indican que la posición del sitio de escisión en el ARN diana está definida por el extremo 5' de la secuencia guía de ARNsi en lugar del extremo 3' (Elbashir y col., 2001, EMBO J., 20, 6877). Otros estudios han indicado que se requiere un fosfato 5' en la cadena complementaria diana de un dúplex de ARNsi para la actividad de ARNsi y que se utiliza ATP para mantener el resto de fosfato 5' en el ARNsi (Nykanen y col., 2001, Cell, 107, 309).

Los estudios han demostrado que el reemplazo de los segmentos salientes 3' de un dúplex de ARNsi de 21 unidades que tiene 2 salientes nucleotídicos 3' con desoxirribonucleótidos no tiene un efecto adverso sobre la actividad de iARN. El reemplazo de hasta 4 nucleótidos en cada extremo del ARNsi con desoxirribonucleótidos se ha informado que se tolera bien mientras que la sustitución completa con desoxirribonucleótidos da como resultado la ausencia de actividad de iARN (Elbashir y col., 2001, EMBO J., 20, 6877). Adicionalmente, Elbashir y col., mencionado anteriormente, también informan que la sustitución de ARNsi con nucleótidos 2'-O-metilo anula completamente la actividad iARN. Li y col., Publicación Internacional PCT N° WO 00/44914, y Beach y col., Publicación Internacional PCT N° WO 01/68836 ambos sugieren que el ARNsi "puede incluir modificaciones en la estructura de azúcar fosfato o el nucleósido para que incluya al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre", sin embargo ninguna solicitud explica hasta qué grado se toleran estas modificaciones en moléculas de ARNsi ni proporcionan ejemplos de tal ARNsi modificado. Kreutzer y Limmer, Solicitud de Patente Canadiense N° 2.359.180, también describen determinadas modificaciones químicas para su uso en las construcciones de ARNs con el fin de contrarrestar la activación de proteína quinasa PKR dependiente de ARN bicatenario, específicamente nucleótidos 2'-amino o 2'-O-metilo y nucleótidos que contienen un puente de metileno 2'-O o 4'-C. Sin embargo, Kreutzer y Limmer de manera similar no demuestran hasta qué alcance estas modificaciones se toleran en moléculas de ARNsi ni proporcionan ningún ejemplo de tal ARNsi modificado.

Parrish y col., 2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087, ensayaron determinadas modificaciones químicas que se dirigían al gen *unc-22* en *C. elegans* usando transcritos de ARNsi largos (> 25 nt). Los autores describen la introducción de restos tiofosfato en estos transcritos de ARNsi incorporando análogos de nucleótido tiofosfato con ARN polimerasa T7 y T3 y observaron que "los ARN con dos bases modificadas (fósforotioato) también tenían reducciones sustanciales en eficacia ya que se desencadena iARN (datos no mostrados); la modificación de más de dos restos (fósforotioato) desestabiliza enormemente los ARN *in vitro* y no fuimos capaces de ensayar actividades de interferencia". *Id.* en 1081. Los autores también ensayaron determinadas modificaciones en la posición 2' del azúcar nucleotídico en los transcritos de ARNsi largos y observaron que la sustitución de desoxinucleótidos por ribonucleótidos "producía una reducción sustancial en la actividad de interferencia", especialmente en el caso de sustituciones de uridina a timidina y/o citidina a desoxicitidina. *Id.* Adicionalmente, los autores ensayaron determinadas modificaciones de bases, incluyendo sustituir 4-tiouracilo, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 3-(aminoalil) uracilo por uracilo e inosina por guanosina en cadenas sentido y antisentido del ARNsi y observaron que mientras que el 4-tiouracilo y el 5-bromouracilo se toleraban bien, la inosina "producía una reducción sustancial en la actividad de interferencia" cuando se incorporaba en cualquier cadena. La incorporación de 5-yodouracilo y 3-(aminoalil) uracilo en la cadena antisentido también dio como resultado la reducción sustancial en la actividad de iARN.

Beach y col., Publicación Internacional PCT N° WO 01/68836, describen procedimientos específicos para atenuar la expresión génica usando ARNs obtenidos de forma endógena. Tuschl y col., Publicación Internacional PCT N° WO 01/75164, describen un sistema de iARN *in vitro* de *Drosophila* y el uso de moléculas de ARNsi específicas para determinadas aplicaciones genómicas funcionales y determinadas aplicaciones terapéuticas; aunque Tuschl, 2001, Chem Biochem., 2, 239-245, duda que se pueda usar iARN para curar enfermedades genéticas o infección viral debido "al peligro de activar respuesta de interferón". Li y col., Publicación Internacional PCT N° WO 00/44914, describen el uso de ARNs específicos para uso en la atenuación de la expresión de determinados genes diana. Zernicka-Goetz y col., Publicación Internacional PCT N° WO 01/36646, describen determinados procedimientos para inhibir la expresión de genes particulares en células de mamífero usando determinadas moléculas de ARNs. Fire y col., Publicación Internacional PCT N° WO 99/32619, describen procedimientos particulares para introducir

determinadas moléculas de ARNs en células para su uso en la inhibición de la expresión génica. Plaetinck y col., Publicación Internacional PCT N° WO 00/01846, describen determinados procedimientos para identificar genes específicos responsables de conferir un fenotipo particular en una célula usando moléculas de ARNs específicas. Mello y col., Publicación Internacional PCT N° WO 01/29058, describen la identificación de genes específicos implicados en iARN mediada por ARNs. Deschamps Depaillette y col., Publicación Internacional PCT N° WO 99/07409, describen composiciones específicas que consisten en moléculas de ARNs particulares combinadas con determinados agentes antivirales. Driscoll y col., Publicación Internacional PCT N° WO 01/49844, describen construcciones de ADN específicas para su uso para facilitar el silenciamiento génico en organismos diana. Parrish y col., 2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087, describen construcciones de ARNs modificadas químicamente específicas que se dirigen al gen *unc-22* de *C. elegans*. Tuschl y col., Publicación Internacional PCT N° WO 02/44321, describen determinadas construcciones de ARNs sintéticas.

Composiciones y procedimientos de la invención

La invención proporciona anticuerpos anti-Ovr110 de acuerdo con las reivindicaciones que se internalizan tras la unión de Ovr110 en la superficie de la célula en una célula de mamífero. Los anticuerpos anti-Ovr110 también pueden destruir o conducir a la destrucción de células de tumor que portan Ovr110.

No era evidente que Ovr110 tenía capacidad de internalización. Además la capacidad de un anticuerpo de internalizar depende de varios factores incluyendo la afinidad, avidéz e isotipo del anticuerpo y el epítipo al que se une. Se ha demostrado en el presente documento que el Ovr110 de superficie celular tiene capacidad de internalización tras la unión mediante los anticuerpos anti-Ovr110 de la invención. Adicionalmente, se ha demostrado que los anticuerpos anti-Ovr110 de la presente invención se pueden dirigir específicamente a células de tumor que expresan Ovr110 *in vivo* e inhibir o destruir estas células. Estas propiedades de dirección, internalización e inhibidoras del crecimiento de tumor *in vivo* de los anticuerpos anti-Ovr110 hacen a estos anticuerpos muy adecuados para usos terapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de diversos cánceres e incluyendo cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario. La internalización del anticuerpo anti-Ovr110 se prefiere, por ejemplo, si el anticuerpo o conjugado de anticuerpo tiene un sitio intracelular de acción y si el agente citotóxico conjugado con el anticuerpo no atraviesa fácilmente la membrana plasmática (por ejemplo, la toxina caliqueamicina). La internalización no es necesaria si los anticuerpos o el agente conjugado a los anticuerpos no tienen sitios de acción intracelulares, por ejemplo, si el anticuerpo puede destruir la célula tumoral mediante ADCC o algún otro mecanismo.

Los anticuerpos anti-Ovr110 de la invención también tienen diversas aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-Ovr110 de la presente invención pueden ser útiles para el diagnóstico y determinación de fase de cánceres que expresan Ovr110 (por ejemplo, en radioimagenología). Los mismos se pueden usar solos o en combinación con otros marcadores de cáncer ovárico, incluyendo, pero sin limitación, CA125, HE4 y mesotelina. Los anticuerpos también son útiles para purificación o inmunoprecipitación de Ovr110 a partir de células, para detección y cuantificación de Ovr110 *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia de Western, para destruir y eliminar células que expresan Ovr110 a partir de una población de células mixtas como una etapa en la purificación de otras células. Los anticuerpos anti-Ovr110 que se internalizan de la invención pueden estar en diferentes formas abarcadas por la definición de "anticuerpos" en el presente documento. Por tanto, los anticuerpos incluyen anticuerpo de longitud completa o intacto, fragmentos de anticuerpo, anticuerpo de secuencia nativa o variantes de aminoácido, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En anticuerpos de fusión, una secuencia de anticuerpo se fusiona a una secuencia polipeptídica heteróloga. Los anticuerpos se pueden modificar en la región Fc para proporcionar funciones efectoras deseadas. Como se ha descrito con más detalle en las secciones más adelante, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido en la superficie celular puede inducir la citotoxicidad, por ejemplo, a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o mediante el reclutamiento de complemento en citotoxicidad dependiente de complemento o algún otro mecanismo. Como alternativa, cuando es deseable eliminar o reducir la función efectora, de forma de minimizar los efectos secundarios o complicaciones terapéuticas, se pueden usar determinadas regiones Fc diferentes.

El anticuerpo puede competir por unión o se une sustancialmente al mismo epítipo unido por los anticuerpos de la invención. También se consideran los anticuerpos que tienen las características biológicas de los presentes anticuerpos anti-Ovr110 de la invención, por ejemplo, un anticuerpo anti-Ovr110 que tiene las características biológicas de un anticuerpo monoclonal producido mediante los hibridomas de acuerdo con los números de acceso de ATCC PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856 y PTA-5884, incluyendo específicamente las características de dirección, internalización y cualquier inhibición de proliferación celular o citotóxica en tumor *in vivo*.

Específicamente se proporcionan anticuerpos anti-Ovr110 que se unen a un epítipo presente en los aminoácidos 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-210, 210-220, 220-230, 230-240, 240-250, 250-260, 260-270, 270-282 de Ovr110 humano.

Los procedimientos para producir los anticuerpos anteriores se describen con detalle más adelante.

Los presentes anticuerpos anti-Ovr110 son útiles para tratar un cáncer que expresa Ovr110 o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Un cáncer de este tipo incluye cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario, cáncer del tracto urinario, cáncer de pulmón, cáncer mamario, cáncer de colon, cáncer pancreático y cáncer ovárico, más específicamente, adenocarcinoma prostático, carcinomas de células renales, adenocarcinomas colorrectales, adenocarcinomas pulmonares, carcinomas de células escamosas de pulmón y mesotelioma pleural. Los cánceres abarcan cánceres metastásicos de cualquiera de los precedentes, por ejemplo, metástasis de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario. El anticuerpo es capaz de unirse a al menos una parte de las células de cáncer que expresan Ovr110 en el mamífero y preferentemente es uno que no induce o que minimiza la respuesta de HAMA. Preferentemente, el anticuerpo es eficaz para destruir o matar células de tumor que expresan Ovr110 o inhibir el crecimiento de tales células de tumor, *in vitro* o *in vivo*, tras la unión a Ovr110 en la célula. Un anticuerpo de este tipo incluye un anticuerpo anti-Ovr110 desnudo (no conjugado a ningún agente). Los anticuerpos anti-Ovr110 desnudos que tienen propiedades de inhibición de crecimiento de tumor *in vivo* incluyen los anticuerpos descritos en los Ejemplos Experimentales más adelante. Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento celular se pueden conjugar además con un agente citotóxico para volverlos aún más potentes en la destrucción de células tumorales. Las propiedades citotóxicas se pueden conferir a un anticuerpo anti-Ovr110 mediante, por ejemplo, conjugación del anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado como se ha descrito más adelante. El agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento es preferentemente una molécula pequeña. Las toxinas tales como maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina o caliqueamicina y análogos o derivados de las mismas, son preferibles.

La invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención y un vehículo. Para los fines de tratar el cáncer, las composiciones se pueden administrar al paciente que necesita tal tratamiento, donde la composición puede comprender uno o más anticuerpos anti-Ovr110 presentes como un inmunoconjugado o como el anticuerpo desnudo. Además, las composiciones pueden comprender estos anticuerpos en combinación con otros agentes terapéuticos tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo agentes quimioterapéuticos. La invención también proporciona formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención y un vehículo. La formulación puede ser una formulación terapéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-Ovr110 internalizantes. Se incluyen los ácidos nucleicos que codifican las cadenas tanto H como L y especialmente las cadenas con restos de región hipervariable que codifican el anticuerpo de secuencia nativa así como variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.

La invención también proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-Ovr110 internalizante para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa Ovr110 o el alivio de uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpos se pueden administrar a corto plazo (aguda) o crónica o intermitente según sea indicado por un médico. También se proporcionan anticuerpos de la invención para su uso en la inhibición del crecimiento y la muerte de una célula que expresa Ovr110. Finalmente, se proporcionan kits y artículos de preparación que comprenden al menos un anticuerpo de la presente invención, preferentemente al menos un anticuerpo anti-Ovr110 internalizante de la presente invención. Los kits que contienen anticuerpos anti-Ovr110 se usan para detectar la expresión de Ovr-110 o en ensayos terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células Ovr110 o para la purificación y/o inmunoprecipitación de Ovr110 a partir de células. Por ejemplo, para aislamiento y purificación de Ovr110, el kit puede contener un anticuerpo anti-Ovr110 acoplado a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo de tejido o perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). Se pueden proporcionar kits que contienen anticuerpos para la detección y cuantificación de Ovr110 *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia de Western. Tal anticuerpo útil para la detección se puede proporcionar con un marcador tal como un marcador fluorescente o marcador radiactivo.

Producción de anticuerpos anti-Ovr110

A continuación se describen técnicas ilustrativas para la producción de los anticuerpos útiles en la presente invención. Algunas de estas técnicas se describen adicionalmente en el Ejemplo 1. El antígeno Over110 que se tiene que usar para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, el polipéptido de longitud completa o una parte del mismo, que incluye una forma soluble de Ovr110 que carece de la secuencia transmembrana o péptidos sintéticos para partes seleccionadas de la proteína.

Como alternativa, las células que expresan Ovr110 en su superficie celular (por ejemplo, células CHO o NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar Over110; ováricas, pancreáticas, de pulmón, mamarias u otra línea de células de tumor que expresan Ovr110) o membranas preparadas a partir de tales células se pueden usar para generar anticuerpos. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de Ovr110 humano y murino están disponibles como se han proporcionado anteriormente. Ovr110 se puede producir de manera recombinante en y aislarse a partir de, células procariotas, por ejemplo, células bacterianas o células eucariotas usando metodología de ADN recombinante convencional. Ovr110 se puede expresar como una proteína de fusión marcada (por ejemplo, marca de epítipo) u otra para facilitar su aislamiento así como su identificación en diversos ensayos.

Los anticuerpos o proteínas de unión que se unen a diversas etiquetas y secuencias de fusión están disponibles

como se ha elaborado más adelante. Otras formas de Ovr110 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

Etiquetas

5 En la técnica se conocen bien diversos polipéptidos marcadores y sus anticuerpos respectivos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poly-his) o poli-histidina-glicina (poly-his-gly); el polipéptido marcador HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Fiel y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma (Evan y col., *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de glicoproteína D del virus Herpes Simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky y col., *Protein Engineering*, 3 (6): 547-553 (1990)). El péptido FLAG (Hopp y col., *Biotechnology*, 6: 1201-1210 (1988)) se reconoce por un anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 (Eastman Kodak Co., New Haven, CT). La purificación de una proteína que contiene el péptido FLAG se puede realizar mediante cromatografía de inmunoafinidad usando una matriz de afinidad que comprende el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 unido covalentemente a agarosa (Eastman Kodak Co., New Haven, CT). Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido de epítipo KT3 [Martin y col., *Science*, 255: 192-194 (1992)]; un péptido de epítipo de α -tubulina (Skinner y col., *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)); y el péptido marcador de la proteína del gen T7 (Lutz Freyermuth y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87: 6393-6397 (1990)).

Anticuerpos policlonales

20 Los anticuerpos policlonales se generan preferentemente en animales, preferentemente animales no humanos, mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) múltiples del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) a una proteína que es inmunógena en las especies que se tienen que inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar a hemocianina de lapa californiana (KLH), suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, maleimidobenzoil sulfosuccinimida éster (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes. También se pueden preparar conjugados en cultivos de célula recombinante como fusiones de proteína.

30 Se inmunizan animales frente al antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 5-100 pg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en sitios múltiples. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en sitios múltiples. Siete a 14 días más tarde, se toman muestras de sangre de los animales y el suero se ensaya para determinar el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título alcanza la meseta. También, los agentes agregantes tales como alumbre se usan de manera adecuada para potenciar la respuesta inmune.

Anticuerpos monoclonales

40 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col., *Nature* 256: 495 (1975) o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567). En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para inmunización. Como alternativa, se pueden inmunizar los linfocitos *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y después se fusionan con un "compañero de fusión", por ejemplo, una línea de células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies. Principles and Practice*, págs. 103 (Academic Press, 1986)).

45 Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, medio que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia del compañero de fusión no fusionado, por ejemplo, las células de mieloma parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo de los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancia que evita el crecimiento de células sin capacidad de HGPRT.

55 Las células de mieloma compañeras de fusión preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, apoyan la producción estable de nivel elevado de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio selectivo que selecciona frente a las células parentales no fusionadas. Las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como aquellas obtenidas a partir de los tumores de ratón MOPC 21 y MPC-II disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU. y SP-2 y derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland, EE.UU. Las líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)); y

Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

5 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se ensaya para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

10 La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980). Una vez que las células de hibridoma que producen los anticuerpos de la especificidad, afinidad y actividad deseada se identifican, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos convencionales (Goding, *Monoclonal antibodies: Principles and Practice*, pág. 103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Adicionalmente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de ascitis en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en ratones.

15 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada a partir del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o proteína G-Sefarosa) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc..

20 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencía usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transforman o transfectan en células huésped procariotas o eucariotas tales como, por ejemplo, células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de mieloma, que no producen de otra manera proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión acerca de la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opin. in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Chickthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

30 Además, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de bibliotecas de fago de anticuerpo generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fago. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (intervalo nM) mediante intercambio de cadena (Marks y col., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fago muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicionales para aislamiento de anticuerpos monoclonales.

40 El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos de anticuerpo quiméricos o de fusión, por ejemplo, sustituyendo las secuencias de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera humana (CH y CL) por las secuencias murinas homólogas (Patente de los Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison, y col., *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU.*, 81: 6851 (1984)), o fusionando la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o una parte de la secuencia codificante de un polipéptido de no inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptido de no inmunoglobulina pueden sustituir los dominios constantes de un anticuerpo o sustituyen los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Anticuerpos humanizados

50 Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácido introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácido no humanos con frecuencia se denominan restos "importados", que típicamente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar básicamente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann y col., *Nature*, 32: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos Nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se tienen que usar para preparar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y respuesta de HAMA (anticuerpo anti-ratón de humano) cuando el anticuerpo tiene por objeto el uso terapéutico humano. De acuerdo con el procedimiento denominado "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia de dominio V humana que es la más cercana a la del roedor se identifica y la región flanqueante humana (RF) dentro de la misma se acepta para el anticuerpo humanizado (Sims y col., J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia y col., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro procedimiento usa una región flanqueante particular obtenida a partir de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región flanqueante se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 4285 (1992); Presta y col., J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

Además es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la afinidad de unión elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con el procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Están disponibles comúnmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son familiares para los expertos en la técnica.

Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influye sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar restos de RF a partir del receptor e importar secuencias de forma que la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana, se consigue. En general, los restos de región hipervariable están implicados directamente y más sustancialmente en la influencia de la unión a antígeno.

Se consideran diversas formas de anticuerpo anti-Ovr110 humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoc conjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

30 Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado la inhibición completa de producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humanos en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immunol., 7: 33 (1993); Patentes de los Estados Unidos N° 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y como alternativa, la tecnología de presentación en fago (McCafferty y col., Nature 348: 552-553 (1990)) se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, genes de dominio V de anticuerpo se clonan en fase en un gen de proteína de envuelta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también da como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fago se puede realizar en una diversidad de formatos, revisados en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de gen V para presentación en fago. Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V obtenidos a partir de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) básicamente siguiendo las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991) o Griffith y col., EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véanse, también, las Patentes de los Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905. Como se ha descrito anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos por células B activadas *in vitro* (véanse las Patentes de los Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275).

Fragmentos de Anticuerpo

60 En determinadas circunstancias existen ventajas de usar fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos

completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite la eliminación rápida y puede conducir a un acceso mejorado a tumores sólidos. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían a partir de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); y Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar en y secretar a partir de *E. coli*, permitiendo de ese modo la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fago de anticuerpo descritas anteriormente. Como alternativa, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab)₂ (Carter y col., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar fragmentos F(ab)₂ directamente a partir de cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab)₂ con semivida aumentada *in vivo* que comprenden restos de epítipo de unión a receptor de recuperación se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el facultativo experto. El anticuerpo de elección también puede ser un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase el documento WO 93/16185; Patente de los Estados Unidos N° 5.571.894; y Patente de los Estados Unidos N° 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por tanto, los mismos son adecuados para la unión inespecífica reducida durante el uso *in vivo*. Se pueden construir proteínas de fusión sFv para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.641.870 por ejemplo. Tales fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidad de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína Ovr110. Otros anticuerpos de este tipo pueden combinar un sitio de unión a Ovr110 con un sitio de unión por otra proteína. Como alternativa, un brazo anti-Ovr110 se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, C133) o receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de forma de enfocar y localizar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa Ovr110. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan Ovr110. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a Ovr110 y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo saporina, anti-interferon-α, vinca alcaloide, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab)₂). El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la Patente de los Estados Unidos N° 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. En el documento WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fca. La Patente de los Estados Unidos N° 5.821.337 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes ((Millstein y col., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadroma) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales únicamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada y los rendimientos de producto son bajos. En el documento WO 93/08829 y en Trauncker y col., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991) se divulgan procedimientos similares.

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una flexibilidad mayor en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión único cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadena deseada.

Preferentemente, los anticuerpos biespecíficos de este enfoque están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha observado que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina indeseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en únicamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de los Estados Unidos N° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede modificar por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptofano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales largas en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos largas con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Tales anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir las células del sistema inmune a células indeseadas (Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar usando cualquier procedimiento de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados se conocen bien en la técnica y se divulgan en la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en la presencia de un agente de formación de complejo ditiol, arsenita de sodio, para estabilizar ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Después uno de los derivados Fab'-TNB se vuelve a convertir en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Progresos recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos frente a dianas de tumor mamario humano.

Diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes también se han descrito. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina a partir de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y después se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo.

La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU.* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden una VH conectada a una VL mediante un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se ven forzados a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de esa manera dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv (sFv) monocatenarios también se ha informado. Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt y col. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápidamente que un anticuerpo bivalente mediante una célula que expresa un antígeno a la cual se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes a la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en el que la cadena o las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VDI (X1n-VD2-(X2)n-Fc, donde VDI es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: cadena de VH-CHI-engarce flexible-VH-CHI-región Fc; o cadena VH-CHI-VH-CHI-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento comprende además preferentemente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente del presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

Otras modificaciones de secuencia de aminoácidos

Se contempla la modificación o modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-Ovr110 descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-Ovr110 se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo anti-Ovr110 o mediante síntesis peptídica.

Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-Ovr110. Se realiza cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procedimientos postraduccionales del anticuerpo anti-Ovr110, tales como cambiar el número o posición de sitios de glicosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo anti-Ovr110 que son emplazamientos preferidos para mutagénesis se denomina "mutagénesis mediante alanina" como se ha descrito por Cunningham y Wells en Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, un resto o grupo de restos diana dentro del anticuerpo anti-Ovr110 se identifican (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferentemente alanina o polialanina) para influir sobre la interacción de los aminoácidos con el antígeno Ovr110.

Esos emplazamientos de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones después se refinan mediante la introducción de variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí misma no está necesariamente predeterminada. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo mutagénesis mediante alanina o aleatoria en un codón o región diana y las variantes de anticuerpo anti-Ovr110 expresadas se seleccionan para determinar la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácido único o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo anti-Ovr110 con un resto de metionil N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo anti-Ovr110 incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo anti-Ovr110 a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o una fusión a un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo anti-Ovr110 reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de RF. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla I con el encabezado "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ilustrativas" en la Tabla 1 o como se ha descrito más adelante adicionalmente con referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se seleccionan para una

característica deseada.

TABLA I Sustituciones de Aminoácidos

Original	Sustituciones Ilustrativas	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala;	ile
Lys (K)	arg; gin; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala;	leu

5 Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se consiguen seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) de la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) del volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos en base a propiedades de cadena lateral comunes:

10 (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile; (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr; (3) ácidos: asp, glu; (4) básicos: asn, gin, his, lys, arg; (5) restos que influyen sobre la orientación de la cadena: gly, pro; y (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

15 Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-Ovr110 también se puede sustituir, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, se pueden añadir puente o puentes de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

20 Un tipo particularmente preferido de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una manera conveniente de generar tales variantes sustitucionales implica la maduración por afinidad usando presentación en fago. En resumen, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones de aminoácido posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetadas dentro de cada partícula. Después
25 las variantes presentadas en fago se seleccionan de acuerdo con su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de

unión) como se ha divulgado en el presente documento. Con el fin de identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, se puede realizar mutagénesis mediante alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen de forma significativa a la unión a antígeno. Como alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y Ovr110 humano. Tales restos de contacto y restos vecinos son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se han generado tales variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se ha descrito en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Alterar significa eliminar uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación del anticuerpo es típicamente enlazada a N o enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento para unión enzimática de resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación enlazada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxisilina. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue de manera conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que la misma contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación enlazados a N). La alteración se puede preparar mediante la adición de o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación enlazados a O).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-Ovr110 se preparan mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una molécula de ácido nucleico preparada anteriormente que codifica una variante o una versión no variante del anticuerpo anti-Ovr110.

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, de forma de potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, se puede introducir resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de esa manera la formación de puentes de disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron y col., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también se pueden preparar usando agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales como se ha descrito en Wolff y col., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, se puede modificar por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y por lo tanto puede tener capacidades de lisis de complemento y DAC potenciadas. Véase Stevenson y col. Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión a receptor de recuperación" se refiere a un epítipo de la región Fc del anticuerpo.

Selección de anticuerpos con las propiedades deseadas

Las técnicas para generar anticuerpos se han descrito anteriormente. Se pueden seleccionar además los anticuerpos con determinadas características biológicas, según se desee.

Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención se pueden evaluar mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando células que expresan Ovr110 de forma endógena o a continuación de transfección con el gen de Ovr110. Por ejemplo, las líneas de células de tumor y células transfectadas con Ovr110 proporcionadas en el Ejemplo 1 más adelante se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal anti-Ovr110 de la invención a diversas concentraciones durante pocos días (por ejemplo, 2-7) y teñirse con violeta cristal o MTT o analizarse mediante algún ensayo colorimétrico diferente. Otro procedimiento para medir la proliferación sería mediante comparación de la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención. Después del tratamiento con anticuerpos, las células se recogen y la cantidad de radiactividad incorporada en el ADN se cuantifica en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen tratamiento de una línea de células seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de células tumorales *in vivo* se puede determinar de diversas maneras tal como se describe en la sección de Ejemplos

Experimentales más adelante. Preferentemente, la célula de tumor es una que sobreexpresa Ovr110. Preferentemente, el anticuerpo anti-Ovr1110 inhibirá la proliferación celular de una célula de tumor que expresa Ovr110 *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente el 25-100% en comparación con la célula de tumor no tratada, más preferentemente, en aproximadamente el 30-100%, y aún más preferentemente en aproximadamente el 50-100% o el 70-100%, a una concentración de anticuerpos de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células de tumor al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-Ovr110 a aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da como resultado la reducción del tamaño del tumor o de la proliferación de células de tumor dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

Para seleccionar anticuerpos que inducen muerte celular, la pérdida de integridad de membrana como se indica por, por ejemplo, captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD se puede evaluar con relación a un control. Se puede realizar un ensayo de captación de PI en ausencia de complemento y células efectoras inmunes. Las células de tumor que expresan Ovr110 se incuban con medio en solitario o medio que contiene el anticuerpo monoclonal apropiado a, por ejemplo, aproximadamente 10 µg/ml. Las células se incuban durante un período de tiempo de 3 días. A continuación de cada tratamiento, las células se lavan y se distribuyen en alícuotas en 12 x 75 tubos con filtro tapados de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para eliminación de grupos de células. Después los tubos reciben PI (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Estos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular determinados por la captación de PI se pueden seleccionar como anticuerpos que inducen la muerte celular.

Para seleccionar anticuerpos que se unen a un epítipo en Ovr110 unidos por un anticuerpo de interés, por ejemplo, los anticuerpos Ovr110 de la presente invención, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina tal como el que se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo se puede usar para determinar si un anticuerpo de ensayo se une en el mismo sitio o epítipo que un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención. Como alternativa o adicionalmente, se puede realizar cartografía de epítipo mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de anticuerpos se puede mutagenizar tal como mediante alanina, para identificar restos de contacto. El anticuerpo mutante se ensaya inicialmente para determinar la unión con anticuerpo policlonal para asegurar el plegamiento apropiado. En un procedimiento diferente, los péptidos que corresponden a diferentes regiones de Ovr110 se pueden usar en ensayos de competición con los anticuerpos de ensayo o con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

Por ejemplo, un procedimiento para seleccionar anticuerpos que se unen a un epítipo que está unido por un anticuerpo, la presente invención puede comprender combinar una muestra que contiene Ovr110 con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo de la presente invención para formar una mezcla, después se determina el nivel de anticuerpo Ovr110 unido a Ovr110 en la mezcla y se compara con el nivel de anticuerpo Ovr110 unido en la mezcla a una mezcla de control, donde el nivel de anticuerpo Ovr110 que se une a Ovr110 en la mezcla en comparación con el control es indicativo de la unión del anticuerpo de ensayo a un epítipo que está unido por el anticuerpo anti-Ovr110 de la presente invención. El nivel de anticuerpo Ovr110 unido a Ovr110 se determina mediante ELISA. El control puede ser un control positivo o negativo o ambos. Por ejemplo, el control puede ser una mezcla de Ovr110, anticuerpo Ovr110 de la presente invención y un anticuerpo que se conoce que se une al epítipo unido por el anticuerpo Ovr110 de la presente invención. El anticuerpo anti-Ovr110 marcado con un marcador tal como los que se divulgan en el presente documento. El Ovr110 se puede unir a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo de tejido o a perlas, por ejemplo, perlas de sefarsa.

Inmunoconjugados

La invención también se refiere a terapia con inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente anti-cáncer tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

Maitansina y maitansinoide

Preferentemente, un anticuerpo anti-Ovr110 (de longitud completa o fragmentos) de la invención se conjuga a una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir de la progenie del arbusto Africano *Maytenus serrata* (Patente de los Estados Unidos

Nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de los Estados Unidos Nº 4.151.042). Maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

Conjugados maitansinoide-anticuerpo

En un intento de mejorar su índice terapéutico, maitansina y maitansinoides de han conjugado con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.208.020, 5.416.064 y la Patente Europea EP 0 425 235 Bl. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DMI enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido frente a cáncer colorrectal humano. El conjugado se observó que era altamente citotóxico frente a células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumor *in vivo*. Chari y col. Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó a través de un engarce de disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en las líneas de células de cáncer de colon humano o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogen HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea de células de cáncer mamario humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que se podría aumentar aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Conjugados anticuerpo anti-ovr110-maitansinoide (inmunoconjugados)

Se preparan conjugados anticuerpo anti-Ovr110-maitansinoide enlazando químicamente un anticuerpo anti-Ovr110 a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo ni de la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia para potenciar la citotoxicidad de células diana sin influir negativamente sobre la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potencie la citotoxicidad con relación al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse a partir de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se divulgan, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no de patente a las que se hace referencia en el presente documento anteriormente. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de unión conocidos en la técnica para preparar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los que se describen en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.208.020 o en la Patente EP 0 425 235 B 1 y Chari y col. Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de unión incluyen puentes de disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa o grupos lábiles a esterasa, como se divulga en las patentes identificadas anteriormente, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter. Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden preparar usando una diversidad de agentes de acoplamiento a proteína bifuncional tales como propionato de N-succinimidil (2-piridilditio) (SPDP), succinimidil- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados funcionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-ácido (tales como bis (p-ácidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6diisocianato) y compuestos de flúor bis activos (tales como 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen propionato de N-succinimidil (2-piridilditio) (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]) y N-succinimidil (2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace de disulfuro.

El engarce se puede unir a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster se puede formar mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnica de acoplamiento convencionales. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la a posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. Preferentemente, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo anti-Ovr110 conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicinas son capaces de producir rupturas de ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véanse las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de la Compañía American Cyanamid). Los análogos estructurados de caliqueamicina que se

pueden usar incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 , (Hinman y col. Cancer Research 53: 3336 (1993), Lode y col. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las Patentes de los Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral en el que se puede conjugar el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpo potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos anti-Ovr110 de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos en conjunto complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de los Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de los Estados Unidos 5.877.296). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, 15 fragmentos activos de no unión de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Fitolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Una diversidad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de anticuerpos anti-Ovr110 radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , In^{111} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, el mismo puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo Tc^{99M} o I^{123} , o un marcador de giro para formación de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como formación de imágenes de resonancia magnética (mri), tales como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los marcadores radiactivos o de otro tipo se pueden incorporar al conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como Tc^{99M} , I^{123} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , se pueden unir a través de un resto de cisteína en el péptido. Se puede unir Itrio-90 a través de un resto de lisina. Se puede usar el procedimiento IODOGEN (Fraker y col (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) para incorporar yodo. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

Los conjugados del anticuerpo y de agente citotóxico se pueden preparar usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como N-succinimidil (2-piridilditio) (SPDP), succinimidil (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-ácido (tales como bis (p-ácidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobeneno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se ha descrito en Vitetta y col. Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil metildietileno triaminopentaacético marcado con carbono (MX-DTPA) es un agente quelante ilustrativo para la conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El engarce puede ser un "engarce escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se pueden usar un engarce lábil a ácido, engarce sensible a peptidasa, engarce fotolábil, engarce de dimetilo o engarce que contiene disulfuro (Chari y col. Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de los Estados Unidos N° 5.208.020).

Como alternativa, una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-Ovr110 y el agente citotóxico se puede preparar, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido de engarce que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

Adicionalmente, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en pre-dirección de tumor en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por la eliminación de conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

55 Terapia de profármaco mediada por enzima dependiente de anticuerpo (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar en ADEPT conjugando el anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidilo, véase el documento W081/01145) en un fármaco anti-cáncer activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la

Patente de los Estados Unidos N° 4.975.278.

- El componente de enzima del inmunoc conjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de una forma tal que lo convierta en su forma citotóxica más activa. Las enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir los fármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-cáncer, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útil para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas de escisión de carbohidratos tales como O-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; P-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con P-lactamos en fármacos libres y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abcimas" se pueden usar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abcima se pueden preparar como se ha descrito en el presente documento para administración de la abcima a una población de células de tumor. Las enzimas de la presente invención se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-Ovr110 mediante técnicas bien conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales descritos anteriormente.
- Como alternativa, se pueden construir proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención enlazada al menos a una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature, 312: 604-608 (1984).

Otras modificaciones de anticuerpo

- Otras modificaciones del anticuerpo se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo se puede enlazar a uno de una diversidad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y propilenglicol. El anticuerpo también se puede encapsular en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

- Los anticuerpos anti-Ovr110 divulgados en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para administrar un fármaco a un mamífero. Los componentes de liposomas se disponen comúnmente en una formación bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los que se describen en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82: 3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU., 77: 4030 (1980); Patentes de los Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se divulgan en la Patente de los Estados Unidos N° 5.013.556. Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se ha descrito en Martin y col. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon y col. J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

- También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo anti-Ovr110 humanizado, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico y técnicas recombinantes para la producción de un anticuerpo. Para la producción recombinante del anticuerpo, la molécula de ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o se inserta en un vector en enlace operable con un promotor para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. Los componentes de vectores generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Componente de secuencia señal

El anticuerpo anti-Ovr110 de la presente invención se puede producir de manera recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde mediante una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariontas que no reconocen y procesan la secuencia señal de anticuerpo anti-Ovr110 nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levadura la secuencia señal nativa se puede sustituir por, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, el líder de factor oc (incluyendo líderes de factor cc de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles la secuencia señal de mamífero así como los líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD de herpes simple. El ADN para tal región precursora se liga en fase de lectura con el ADN que codifica el anticuerpo anti-Ovr110.

Origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que posibilita que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en vectores de clonación esta secuencia es una que posibilita que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación de forma autónoma. Tales secuencias se conocen bien para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (el origen SV40 se puede usar típicamente únicamente debido a que contiene el promotor temprano).

Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metrotexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias autotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para Bacilos. Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Estas células que se transforman de manera satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y de este modo sobrevive el régimen de selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que posibilitan la identificación de células con capacidad de captar el ácido nucleico del anticuerpo anti-Ovr110, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -11, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc. Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR en primer lugar se identifican cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metrotexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) sin capacidad de actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, las células huésped (particularmente huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican anticuerpo anti-Ovr110, proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante cultivo de células en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicósido, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase la Patente de los Estados Unidos N° 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección de una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecimiento en triptofano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4 Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante cultivo en ausencia de triptofano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 ó 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Adicionalmente, los vectores obtenidos a partir del plásmido circular de 1,6 pm pKDI se pueden usar para transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Como alternativa, un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante se informó para *K. lactis*. Van den Berg, Dio/Technology, 8: 135 (1990). Los vectores de expresión multicopia estables para secreción de albúmina sérica humana recombinante

madura mediante cepas industriales de *Kluyveromyces* también se han divulgado. Fleer y col., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

Componente promotor

5 Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico del anticuerpo anti-Ovr110. Los promotores adecuados para uso con huéspedes procariontes incluyen el promotor *phoA*, sistemas de promotor de P-lactamasa y lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptofano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-Ovr110.

10 Las secuencias promotoras se conocen para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región con alto contenido en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas existe una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas. Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído, fosfato deshidrogenasa, exoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa y glucoquinasa.

15 Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan de forma provechosa con promotores de levadura.

20 La transcripción de anticuerpo anti-Ovr110 a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, Virus de hepatitis B y más preferentemente Virus Simio 40 (SV40), a partir de promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, con la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

25 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen de manera conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene de manera conveniente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus de papiloma bovino como un vector se divulga en la Patente de los Estados Unidos N° 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 4.601.978. Véase también Reyes y col., Nature 297: 598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de interferón P humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa para virus de herpes simple. Como alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del Virus de Sarcoma de Rous como el promotor.

Componente de elemento potenciador

30 La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti-Ovr110 de la presente invención mediante eucariotas superiores con frecuencia se aumenta mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen actualmente a partir de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente se usará un potenciador de un virus de una célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) acerca de los elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el anticuerpo anti-Ovr110, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

Componente de terminación de transcripción

35 Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están disponibles comúnmente a partir de las regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3' de ADN o ADNc eucariotas o virales.

Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica anticuerpo anti-Ovr110. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión divulgado en el mismo.

5 Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266,710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W31 10 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Se pueden producir anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpo en bacterias, en particular cuando no se necesita la función de glicosilación y efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí mismo muestra eficacia en destrucción de células de tumor. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida mayor en la circulación. La producción de *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, el documento U.S. 5.648.237 (Carter y col.), el documento U.S. 5.789.199 (Joly y col.) y el documento U.S.5.840.523 (Simmons y col.) que describen la región de inicio de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla a partir de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través de, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de manera similar al procedimiento para purificar anticuerpos expresados, por ejemplo, en células CHO.

Adicionalmente a procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpo anti-Ovr110. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura del pan común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, están disponibles comúnmente y son útiles en el presente documento muchos otros géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-Ovr110 glicosilado se obtienen a partir de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y células huésped de insectos permisivas correspondientes a partir de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles al público una diversidad de cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV y tales virus se pueden usar como el virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células de planta de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, *Arabidopsis* y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes. Los vectores de clonación y expresión útiles en la producción de proteínas en cultivo de células de plantas se conocen por los expertos en la técnica. Véase por ejemplo Hiatt y col., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen y col. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko y col. (1995) *The Plant J* 8: 745-750, y Fecker y col. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrado y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 ó 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.* 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/DHFR (CHO, Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, 1413 8065); tumor mamario de ratón

(MMT 060562, ATCC CCL5 1); células TRI (Mather y col., Annals N. Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpo anti-Ovr110 y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, selección de transformantes o amplificación de genes que codifican las secuencias deseadas.

Cultivo de células huésped

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo anti-Ovr110 de la presente invención se pueden cultivar en una diversidad de medios. Los medios disponibles en el mercado tales como Ham's F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de los Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 ó 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la Patente de los Estados Unidos Re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), elementos trazas (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario en concentraciones apropiadas que sería conocido por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas usadas previamente con la célula huésped seleccionada para expresión y serán evidentes para los expertos habituales en la técnica.

Purificación de anticuerpo anti-Ovr110

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico o directamente secretarse en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los detritos de partículas, células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fenimetilsulfonilfluoruro (PMSF) a lo largo de aproximadamente 30 min. Los detritos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión en primer lugar generalmente se concentran usando un filtro de concentración de proteína disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de la célula se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel y cromatografía de afinidad, con la cromatografía de afinidad siendo la técnica de purificación preferida. La idoneidad de proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ó $\gamma 4$ (Lindmark y col., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss y col., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. Otras técnicas para purificación de proteína tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SIDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se tiene que recuperar.

A continuación de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente realizada a concentraciones de sal bajas (por ejemplo, desde aproximadamente 0-0,25 M de sal).

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos usados de acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol,

A. Ed.(1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como acetato, tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; agentes de tonicidad tales como trehalosa y cloruro de sodio; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivos tales como polisorbato; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo preferentemente comprende el anticuerpo en una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferentemente entre 10-100 mg/ml.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando; preferentemente aquellos con actividades complementarias que no afecten negativamente a los demás. Por ejemplo, además del anticuerpo anti-Ovr110 que internaliza, puede ser deseable incluir en una formulación, un anticuerpo adicional, por ejemplo un segundo anticuerpo anti-Ovr110 que se une a un epítipo diferente en Ovr110 o un anticuerpo frente a otra diana tal como un factor del crecimiento que influya sobre el crecimiento del cáncer particular. Como alternativa o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Tales moléculas están presentes de forma adecuada en combinación o en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los ingredientes activos también se pueden encapsular en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos formados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matriz de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-) hidroxibutírico.

Las formulaciones que se tienen que usar par administración *in vivo* tienen que ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

40 **Procedimientos y tratamiento que usan anticuerpos anti-Ovr110**

De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo anti-Ovr110 que se internaliza tras la unión a Ovr110 en una superficie celular se usa para tratar un sujeto que necesita el mismo que tiene un cáncer que se caracteriza por células de cáncer que expresan Ovr110, en particular, cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario, tal como adenocarcinoma seroso ovárico o carcinoma ductal infiltrante mamario y metástasis asociadas.

45 El cáncer generalmente comprenderá células que expresan Ovr110, de forma que el anticuerpo anti-Ovr110 es capaz de unirse a las mismas. Aunque el cáncer puede caracterizarse por sobreexpresión de la molécula de Ovr110, la presente solicitud proporciona además un procedimiento para tratar cáncer que no se considera un cáncer que sobreexpresa Ovr110.

50 La presente invención también se refiere a los anticuerpos de la invención para su uso en procedimientos para detectar células que sobreexpresan Ovr110 y a kits de diagnóstico útiles para detectar células que expresan Ovr110 o para detectar Ovr110 en suero de un paciente. Los procedimientos pueden comprender combinar una muestra de ensayo que contiene células con un anticuerpo de la presente invención, ensayar la muestra de ensayo para determinar la unión de anticuerpo a células en la muestra de ensayo y comparar el nivel de unión de anticuerpo en la muestra de ensayo con el nivel de unión de anticuerpo en una muestra de células de control. Un control adecuado es, por ejemplo, una muestra de células normales del mismo tipo que la muestra de ensayo o una muestra de células que se sabe que no tiene células que sobreexpresan Ovr110. Un nivel de unión de Ovr110 más elevado que el de una muestra de control sería un indicativo de que la muestra de ensayo contiene células que sobreexpresan Ovr110. Como alternativa, el control puede ser una muestra de células que se conoce que contiene células que sobreexpresan Ovr110. En este caso, un nivel de unión de anticuerpo a Ovr110 en la muestra de ensayo que es

similar a o que excede el de la muestra de control sería indicativo de que la muestra de ensayo contiene células que sobreexpresan Ovr110.

5 La sobreexpresión de Ovr110 se puede detectar con diversos ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, la sobreexpresión de Ovr110 se puede ensayar mediante inmunohistoquímica (IHC). Cortes de tejido incrustados en parafina a partir de una biopsia de tumor se pueden someter al ensayo de IHC y se acuerda un criterio de intensidad de tinción de proteína Ovr110 de la manera siguiente.

Puntuación 0 no se observa tinción o la tinción de membrana se observa en menos del 10% de las células tumorales.

10 Puntuación 1+ se detecta una tinción de membrana débil/apenas perceptible en más del 10% de las células tumorales. Las células están teñidas únicamente en parte de su membrana.

Puntuación 2+ se observa una tinción de membrana completa débil a moderada en más del 10% de las células tumorales.

Puntuación 3+ se observa una tinción de membrana completa moderada a marcada en más del 10% de las células tumorales.

15 Aquellos tumores con puntuaciones 0 ó 1+ para expresión de Ovr110 se pueden caracterizar como que no sobreexpresan Ovr110, mientras que aquellos tumores con puntuaciones 2+ o 3+ se pueden caracterizar como que sobreexpresan Ovr110.

20 Como alternativa o adicionalmente, se pueden llevar a cabo ensayos FISH tales como INFORM™ (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (VySiS, Illinois) en tejido de tumor incrustado en parafina y fijado con formalina para determinar el alcance (si existe alguno) de sobreexpresión de Ovr110 en el tumor. La sobreexpresión o amplificación de Ovr110 se puede evaluar usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo administrando una molécula (tal como un anticuerpo de la presente invención) que se une a Ovr110 y que está marcada con un marcador detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo o un marcador fluorescente) y explorando externamente el paciente para la localización del marcador.

25 Una muestra que se sospecha que contiene células que expresan o sobreexpresan Ovr110 se combina con los anticuerpos de la presente invención en condiciones adecuadas para la unión específica de los anticuerpos a Ovr110. La unión y/o internalización de los anticuerpos de Ovr110 de la presente invención es indicativa de que las células expresan Ovr110. El nivel de unión se puede determinar y comparar con un control adecuado, donde un nivel elevado de Ovr110 unido en comparación con el control es indicativo de sobreexpresión de Ovr110. La muestra
30 que se sospecha que contiene células que sobreexpresan Ovr110 puede ser una muestra de células de cáncer, particularmente una muestra de un cáncer ovárico, por ejemplo adenocarcinoma seroso ovárico o un cáncer mamario, por ejemplo, un carcinoma ductal infiltrante mamario. Una muestra de suero a partir de un sujeto también se puede ensayar para determinar los niveles de Ovr110 combinando una muestra de suero de un sujeto con un anticuerpo Ovr110 de la presente invención, determinando el nivel de Ovr110 unido al anticuerpo y comparando el
35 nivel con un control, donde un nivel elevado de Ovr110 en el suero del paciente en comparación con un control es indicativo de sobreexpresión de Ovr110 por las células en el paciente. El sujeto puede tener un cáncer tal como por ejemplo, un cáncer ovárico, por ejemplo adenocarcinoma seroso ovárico o un cáncer mamario, por ejemplo carcinoma ductal infiltrante mamario.

40 Actualmente, dependiendo de la fase del cáncer, el tratamiento de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, terapia de radiación, privación androgénica (por ejemplo, terapia hormonal) y quimioterapia. La terapia de anticuerpo anti-Ovr110 puede ser especialmente deseable en pacientes de edad avanzada que no toleran la toxicidad y efectos secundarios de la quimioterapia bien, en enfermedad metastásica donde la terapia de radiación tiene utilidad limitada y para el tratamiento de carcinoma prostático que es resistente al tratamiento de privación de andrógeno.
45 Los anticuerpos anti-Ovr110 que se dirigen a e internalizan en el tumor de la invención son útiles para aliviar cánceres que expresan Ovr110, por ejemplo, cánceres ovárico, pancreático, de pulmón o mamario tras el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-Ovr110 se puede usar en solitario o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogénicos o compuestos marcados radiactivamente o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia, específicamente para cánceres ováricos,
50 pancreático, de pulmón o mamario, también particularmente donde no se pueden alcanzar las células que se desprenden. El tratamiento con anticuerpo anti-Ovr110 se puede administrar junto con otras formas de terapia convencional, de manera consecutiva con, antes o después de terapia convencional, fármacos quimioterapéuticos tales como Taxotere® (docetaxel), Taxol® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona se usan en el tratamiento de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario refractario a hormona y metastático, en particular, en pacientes
55 con escaso riesgo. En el presente procedimiento de la invención para tratar o aliviar el cáncer, en particular, cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario independiente de andrógeno y/o metastático, al paciente de cáncer se puede administrar anticuerpo anti-Ovr110 junto con tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriores. En particular, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (véase, por

ejemplo, el documento EP0600517). El anticuerpo anti-Ovr110 se administrará con una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico. El anticuerpo anti-Ovr110 también se puede administrar junto con quimioterapia para potenciar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. El Physicians' Desk Reference (PDR) divulga dosis de estos agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosis de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerá del cáncer particular que se esté tratando, el alcance de la enfermedad y otros factores familiares para el médico experto en la materia y se pueden determinar por el médico.

Particularmente, se puede administrar al paciente un inmunocombinado que comprende el anticuerpo anti-Ovr110 conjugado con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunocombinado unido a la proteína Ovr110 se internaliza por la célula, dando como resultado una eficacia terapéutica aumentada del inmunocombinado para destruir la célula de cáncer a la cual se une. Preferentemente, el agente citotóxico se dirige o interfiere con el ácido nucleico en la célula de cáncer. Los ejemplos de tales agentes citotóxicos se describen anteriormente e incluyen maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina, caliqueamicina, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

Los anticuerpos anti-Ovr110 o inmunocombinados se administran a un paciente humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Los anticuerpos o inmunocombinados se pueden inyectar directamente en la masa tumoral. La administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo se prefiere. Otros regímenes terapéuticos se pueden combinar con la administración del anticuerpo anti-Ovr110.

La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente existe un periodo de tiempo durante el cual ambos (o todos) los agentes activos ejercen de manera simultánea sus actividades biológicas. Preferentemente tal terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico.

También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo anti-Ovr110 o anticuerpos con administración de un anticuerpo dirigido frente a otro antígeno tumoral asociado con el cáncer particular. Como tal, la presente invención también se refiere a un "cóctel" de anticuerpo que comprende uno o más anticuerpos de la presente invención y al menos un anticuerpo diferente que se une a otro antígeno tumoral asociado con las células de tumor que expresan Ovr110. El cóctel también puede comprender anticuerpos que se dirigen a otros epítopos de Ovr110. Preferentemente los otros anticuerpos no interfieren con la unión y/o internalización de los anticuerpos de la presente invención.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar en un procedimiento de tratamiento terapéutico de anticuerpo de la presente invención que puede implicar la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti-Ovr110 y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la administración conjunta de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalan, ciclofosfamida, hidroxurea e hidroxurea taxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según se determine empíricamente por el facultativo experto. La preparación y programas de dosificación de tal quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

El anticuerpo se puede combinar con un compuesto anti-hormonal; por ejemplo, un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifeno; un antiprogesterona tal como onapristona (véase el documento EP 616 812); o un antiandrógeno tal como flutamida, en dosis conocidas para tales moléculas. Cuando el cáncer que se tiene que tratar es cáncer independiente de andrógeno, el paciente se puede haber sometido previamente a terapia antiandrógeno y, después de que el cáncer se vuelve independiente de andrógeno, se puede administrar el anticuerpo anti-Ovr110 (y opcionalmente otros agentes como se ha descrito en el presente documento) al paciente.

Algunas veces, puede ser beneficioso también administrar conjuntamente un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Adicionalmente a los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a eliminación quirúrgica de células de cáncer y/o terapia de radiación, antes, simultáneamente con o después de la terapia de anticuerpo. Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes administrados de manera conjunta son aquellas que se usan actualmente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti-Ovr110.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis y modo de administración se elegirá por el médico de acuerdo con criterios conocidos. La dosis apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad que se tiene que tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente en una vez o a través de una serie de tratamientos. Preferentemente, el anticuerpo se administra mediante infusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 pg/kg a

aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1- 15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido por una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-Ovr110. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. Una dosis diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 pg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que ocurre una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia se puede supervisar fácilmente mediante procedimientos convencionales y ensayos y se basa en criterios conocidos por el médico u otras personas expertas en la técnica.

Aparte de la administración de la proteína de anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Tal administración de una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo está incluida en la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, el documento WO 96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 referente al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Existen dos enfoques principales para introducir la molécula de ácido nucleico (opcionalmente contenida en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo* la molécula de ácido nucleico se tiene que inyectar directamente en el paciente, habitualmente en el sitio en el que se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se retiran, la molécula de ácido nucleico se introduce en esas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.892.538 y 5.283.187). Existe una diversidad de técnicas disponibles para introducir moléculas de ácido nucleico en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación de fosfato de calcio, etc. Un vector usado comúnmente para la administración *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

Las técnicas de transferencia de molécula de ácido nucleico *in vivo* preferidas actualmente incluyen la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus de Herpes simple I o virus adenoasociado) y sistemas basados en lípido (los lípidos útiles para transferencia mediada por lípido del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para una revisión de los protocolos actuales de marcaje de genes y terapia génica conocidos véase Anderson y col., Science 256: 808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en el mismo.

Artículos de fabricación y kits

También se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para la detección de células que sobreexpresan Ovr110 y/o el tratamiento de cáncer que expresa Ovr110, en particular cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo que comprende un anticuerpo de la presente invención. La composición puede comprender además un vehículo. El artículo de fabricación puede también comprender una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para detectar células que expresan Ovr110 y/o tratar una afección de cáncer y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para detectar células que expresan Ovr110 y/o para tratar cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario o más específicamente adenocarcinoma seroso ovárico o cáncer de carcinoma ductal infiltrante mamario, en un paciente que lo necesita. La etiqueta o prospecto puede comprender además instrucciones para administrar la composición de anticuerpo a un paciente de cáncer. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende una sustancia que detecta el anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, un segundo anticuerpo que se une a los anticuerpos de la presente invención. La sustancia se puede marcar con un marcador detectable tales como los que se divulgan en el presente documento. El segundo recipiente puede contener, por ejemplo, un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles con diversos fines, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células Ovr110, para purificación o inmunoprecipitación de Ovr110 a partir de células o para detectar la presencia de Ovr110 en una muestra de suero o detectar la presencia de células que expresan Ovr110 en una muestra de células. Para aislamiento o purificación de Ovr110 el kit puede contener un anticuerpo anti-Ovr110 acoplado a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo de tejidos o perlas (por ejemplo, perlas de sefrosa). Se pueden proporcionar kits que contienen los anticuerpos para detección y cuantificación de Ovr110 *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o una

transferencia de Western. Al igual que con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo que comprende un anticuerpo de la presente invención. El kit puede comprender además una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los kits pueden comprender componentes adicionales, por ejemplo, diluyentes y tampones, sustancias que se unen a los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo, un segundo anticuerpo que puede comprender un marcador tal como los que se divulgan en el presente documento, por ejemplo, un marcador radiactivo, marcador fluorescente o enzima o el kit también puede comprender anticuerpos de control. Los componentes adicionales pueden estar dentro de recipientes separados dentro del kit. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso *in vitro* o de diagnóstico pretendido.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Producción y aislamiento de hibridomas que producen anticuerpo monoclonal

Los siguientes MAb/hibridomas de la presente invención se describen más adelante:

Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (identificado previamente como Ovr110.A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A.99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1., Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1 y Ovr110.C17.1. Si el MAb se ha clonado, el mismo tendrá la nomenclatura "X.1", por ejemplo, el primer clon de A7 se denominará A7.1, el segundo clon de A7 se denominará A7.2, etc. Con los fines de la presente invención, una referencia a A7 incluirá todos los clones, por ejemplo, A7.1, A7.2, etc.

20 Inmunógenos y antígenos (proteínas recombinantes, etiquetas HA y His y células transfectadas)

Secuencia de Ovr110A y producción de proteína

Un ADN de longitud completa que codifica la secuencia de proteína Ovr110 inmadura completa desde Met1 hasta Lys282 (SEC ID N°: 1) se insertó en un vector modificado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de secreción de 17 aminoácidos a partir de estaniocalcina humana (STC) y una secuencia que codifica una etiqueta 6 His, para generar un vector que codifica una proteína de fusión Ovr110 recombinante que tiene la señal de secreción fusionada en el extremo N y la etiqueta 6 His fusionada en el extremo C de la proteína Ovr110. El vector resultante se usó para producir la proteína recombinante usando procedimientos convencionales. En resumen, células transformadas con los vectores resultantes se cultivaron en condiciones adecuadas para la producción de la proteína Ovr110 recombinante. Las células transfectadas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y se lisaron en 5 volúmenes (5 ml/g de células) de fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0, que contenía cloruro de sodio 0,8 M, Zwittergent 3-14 al 0,3% y octil fosfoglicósido al 0,1% mediante sonicación. El material insoluble se aisló como un precipitado y la extracción se repitió dos veces. El precipitado aislado se disolvió en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,8, que contiene clorhidrato de guanidina 6 M (3 ml/g células) y se hizo circular a través de una columna de 10-ml-Ni-NTA (Qiagen, Alameda, CA) equilibrada con el mismo tampón en un sistema Akta -100 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) durante aproximadamente 40 volúmenes de columna (VC) al caudal de 5 ml/min. Después la columna se lavó con 2 VC del mismo tampón de fosfato-guanidina, 2 VC del imidazol 20 mM, 2 VC del imidazol 50 mM y 4 VC del imidazol 100 mM en el tampón de fosfato-guanidina anterior.

Ovr110A se eluyó con 4VC de imidazol 500 mM en tampón fosfato-guanidina y la columna se lavó adicionalmente con 4 VC de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,6, que contiene imidazol 1 M y clorhidrato de guanidina 6 M. Muestras de las fracciones recogidas se sometieron a SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western para evaluar la pureza de Ovr110A. Las fracciones purificadas se combinaron y dializaron frente a PBS. Los precipitados se recogieron y resuspendieron en un volumen menor de PBS mediante sonicación breve.

Secuencia de Aminoácidos de Ovr110A (SEC ID N°: 1)

1	11	21	31	41	51	
1	MLQNSAVLLV	LVISASATMA	SLGQILFWSI	ISIIIIILAGA	IALIIGFGIS	GRHSITVTTV 60
61	ASAGNIGEDG	IQSCTFEPDI	KLSDIVIQWL	KEGVLGLVHE	FKEGKDELSE	QDEMFRGRTA 120
121	VFADQVIVGN	ASLRLKNVQL	TDAGTYKCYI	ITSRGKGNAN	LEYKTGAFSM	PEVNVVDYNAS 180
181	SETLRCEAPR	WFPQPTVVA	SQVDQGANFS	EVNTSPELN	SENVTKVVS	VLYNVTINNT 240
241	YSCMIENDIA	KATGDIKYTE	SEIKRRSHLQ	LLNSKASLCV	SSFFAISWAL	LPLSPYLMLK 300
	HHHHHH					

Secuencia de Ovr110B y producción de proteína

Para inmunización de ratones, se generó un fragmento de proteína recombinante Ovr110, que constituía únicamente la parte extracelular pronosticada de la molécula, con el fin de seleccionar anticuerpos monoclonales (MAb) que se unirían en el exterior de la superficie celular. Un fragmento de ADN que codifica la secuencia de Ovr110 desde Gly30 (subrayado en la secuencia más adelante) hasta Lys282 (más una Met en la posición del codón de inicio) de la proteína inmadura, incluyendo el péptido señal, se insertó en un vector modificado, que contenía una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de secreción de 17 aminoácidos a partir de estaniocalcina humana (STC) y una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta 6 His de forma que el vector codificaba una proteína de fusión Ovr110 recombinante que tiene la secuencia de señal de secreción de 17 aminoácidos a partir de la estaniocalcina humana (STC) fusionada al extremo N y la etiqueta 6 His fusionada al extremo C de la proteína Ovr110 (Ovr110B). El vector resultante se usó para transformar bacterias DH10Bac para generación del vector de infección mediante transposición. Después se generaron baculovirus recombinantes mediante transfección de células Sf9 con el vector transpuesto. Ovr110B recombinante se expresó mediante infección de la línea de células Hi5 con las partículas de virus amplificadas y recogidas.

Los medios de cultivo de las células Hi5 recombinantes se recogieron 48 h después de la infección. Los medios se concentraron 10 veces y se diafiltraron con 30 volúmenes de PBS, pH 7,9. El material diafiltrado después se incubó con 10 ml de gel de flujo rápido Ni-NTA (Qiagen) durante una noche a 4 °C en presencia del cóctel de proteasa-inhibidor. Los geles se vertieron en una columna SK y se lavaron con 2 VC de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, que contenía cloruro de sodio 0,5 M. Ovr110B se eluyó mediante aumento gradual de imidazol en el mismo tampón de cloruro de sodio-fosfato (4 VC de 20 mM, 4 VC de 50 mM, 4 VC de 100 mM, 4 VC de 50 mM y 2 VC de 1000 mM). Las muestras de fracciones recogidas se sometieron a SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western para evaluar la pureza de Ovr110B. Las fracciones purificadas se combinaron y concentraron. Los productos finales se dializaron en PBS.

Secuencia de Aminoácidos de Ovr110B (SEC ID N°: 2)

1	11	21	31	41	51	
1	MLQNSAVLLV	LVISASATMG	ISGRHSITVT	TVASAGNIGE	DGIQSCTFEP	DIKLSDIVIQ
61	WLKEGVLGLV	HEPKEGKDEL	SEQDEMFRGR	TAVPADQVIV	GNASLRLKNV	QLTDAGTYKC
121	YIITSKGGKN	ANLEYKTGAF	SMPEVNVVDYN	ASSETLRCEA	PRWFPQPTVV	WASQVDQGAN
181	FSEVNTSFE	LNSENVTKV	VSVLYNVTIN	NTYSMIEND	IAKATGDIKV	TESEIKRRSH
241	LQLLNKASL	CVSSFFAISW	ALLPLSPYLM	LKHEHHHH		

Secuencia y producción de proteína Ovr110 expresada en células de mamífero:

Una molécula de ácido nucleico que codifica Ovr110 desde Gly30 hasta Lys282 se generó a partir de un vector lanzadera que contiene un ADNc de Ovr110 de longitud completa (pDONR201_Ovr110) produciendo un fragmento de PCR usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

ATN496: 5'-CCA ATG CAT GGT ATT TCA GGG AGA CAC TCC (SEC ID N°: 3)

ATN552: 5'-CG GCT AGC TTT TAG CAT CAG GTA AGG GCT G (SEC ID N°: 4).

El fragmento de PCR se digirió con Nsil y NheI, y se clonó en fase en un vector de expresión de mamífero modificado pCMV5His2 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de secreción de estaniocalcina 1 humana (STC-1) y la secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta de diez histidina para producir el plásmido recombinante pCMV5jos2_Ovr110 que codificaba una proteína Ovr110 recombinante que tiene la señal de secreción de estaniocalcina 1 humana (STC-1) fusionada al extremo NH₂ y una etiqueta de diez histidina fusionada al extremo COOH, respectivamente. El análisis de secuencia de ADN se realizó usando un kit de reacción listo de secuenciación de ciclo por terminador ABI Prism Big Dye de PEApplied Biosystems (Foster City, CA).

El plásmido recombinante, pCMV5His2_Ovr110, se usó para transfectar células 293T en cultivo en suspensión (un litro de medio sin suero) en un matraz de agitación.

El medio de cultivo se recogió 48 horas después de la transfección. El medio se concentró 10 veces y se diafiltró con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 400 mM, glicerol al 10%, pH 8,0. El medio concentrado que contiene Ovr110 se pasó sobre una columna quelante de metal níquel de 5 ml (Ni-NTA fast flow, Qiagen Inc.), que se había equilibrado previamente con fosfato de sodio 100 mM, NaCl 400 mM, glicerol al 10%, pH 8,0. Después la columna se lavó con 6 volúmenes de columna (VC) de fosfato de sodio 100 mM, NaCl 400 mM, imidazol 2 mM, glicerol al 10%, pH 8,0. Ovr110 se eluyó de la columna usando 22 VC de fosfato de sodio 100 mM, NaCl 400 mM, glicerol al 10%, pH 8,0 que contenía imidazol 5 mM e imidazol 500 mM, respectivamente. Las fracciones que contienen Ovr110 se combinaron y dializaron en fosfato de sodio 100 mM, NaCl 400 mM, glicerol al 5%, pH 7,5.

Ovr110 con señal de secreción STC-1 (la secuencia de Ovr110 está subrayada)
(SEC ID N°: 5)

MLQNSAVLLVIVISASATHEAEQSRMHGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
DIVIQLWKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTDAGTY
KCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSPMEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANF
SEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLNVVTINNTYSMIENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLL
NSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLKASHHHHHHHHHH

Secuencia de BTLA y producción de proteína:

5 Una molécula de ácido nucleico que codifica una BTLA humana de longitud completa (hBTLA), desde Met1 hasta Ser289, se clonó mediante PCR a partir de bibliotecas de ADNc de la glándula pituitaria y ganglio linfático usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

ATN551: 5'-CTT TGT TTA AAC ATG AAG ACA TTG CCT GCC ATG (SEC ID N°: 6) y

ATN552: 5'-CG GCT AGC ACT CCT CAC ACA TAT GGA TGC (SEC ID N°: 7).

10 Un gen de hBTLA truncado que codifica Met1-Pro152, que abarca el dominio de inmunoglobulina de superficie (Ig), se clonó mediante PCR a partir de una biblioteca de ADNc de linfoma de Burkitt usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

ATN551: (véase la secuencia anterior) SEC ID N°: 6 y

ATN554: 5'-CG GCT AGC GGG TCT GCT TGC CAC TTC GTC (SEC ID N°: 8).

15 Una molécula de ácido nucleico que codifica una forma secretada de longitud completa, que carece de dominios transmembrana, de hBTLA, desde Met1-Ser241, se clonó mediante PCR a partir de una biblioteca de ADNc de ganglio linfático usando cebadores de oligonucleótidos ATN551 y ATN552. Los fragmentos de PCR se digirieron con PmeI y NheI y se ligaron en pCMV5HIS2 o pCMV5Fc1, que se habían cortado con las mismas enzimas, para generar construcciones de proteína que tenían una extensión C terminal AS-HHH-HHHHHHHH o dominio Fc de ratón AS (mFc), respectivamente. El análisis de secuencia de ADN se realizó usando un kit de reacción listo de secuenciación de ciclo por ABI Prism BigDye de PE Applied Biosystems (Foster City, CA).

20 El plásmido recombinante, pCMV5Fc1_BTLASNT, que codificaba únicamente el dominio de Ig de superficie de hBTLA fusionado a mFc (BTLASNT_mFc), se usó para transfectar células 293T en cultivo en suspensión (un litro de medio sin suero) en un matraz de agitación. El medio de cultivo se recogió 48 horas después de la transfección. Se añadió cloruro de sodio hasta 3 M final al medio recogido y el medio se ajustó hasta pH 8,0. Después el medio que
25 contiene BTLA se pasó sobre una columna de proteína A recombinante de 5 ml, que se había equilibrado previamente con 10 volúmenes de columna (VC) de borato 50 mM, NaCl 4 M, pH 8,0. Después la columna de proteína A se lavó con 30 VC de borato 50 mM, NaCl 4 M, pH 8,0. BTLA5NT_mFc eluido a partir de la columna de proteína A usando 10 CV de citrato 100 mM pH 3,0. Las fracciones que contienen TLA5NT_mFc se neutralizaron con Tris-HCl 1 M, pH 9 y se dializaron en 3 l de PBS, pH 7,5.

Secuencia de BTLA, longitud completa (SEC ID N°: 9)

MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWC
 KLN GTTCVKLEDRQTSWKBEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTDVKSASERPS
 KDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFLCCLRRHQKQNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEASTRONS
 QVLLSETGIYDNDPDL CFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGI VYASLNHNSVIGLNSRLARNVKEAPTEYASICVR
 S

BTLA forma secretada (SEC ID N°: 10)

MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWC
 KLN GTTCVKLEDRQTSWKBEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTGKQNELSDTA
 GREINLVD AHLKSEQTEASTRONSQVLLSETGIYDNDPDL CFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGI VYASLNHNSV
 IGLNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

BTLA5NT_mFc (BTLA secuenciado está subrayado) (SEC ID N°: 11)

MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWC
KLN GTTCVKLEDRQTSWKBEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTDVKSASERPS
KDEMASRFASENLYFQGRGPTIKPCPCPCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDP
DVQISWFVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKOLPAPIERTISKPKGVR
APQVYVLPPEEEMTKQVTLT CMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSGYFMYSKLRVEKNW
VERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Secuencia de Ovr107 y producción de proteína

5 Una proteína Ovr107 recombinante se usó para seleccionar clones de hibridoma polirreactivos. Ovr107 está regulada positivamente ampliamente en múltiples cánceres y la Ovr107 recombinante usada en el presente documento contiene una etiqueta de hexahistidina potencialmente de reacción cruzada. Por tanto la Ovr107 es útil para identificar anticuerpos polirreactivos.

10 Un ADNc de longitud completa que codifica la secuencia de Ovr107 desde Met1 hasta Ile596 (documento WO 01/37864 marcador de cáncer ovárico Ovr107 Humano) se clonó mediante PCR y se insertó en un vector. La región codificante de Ovr107 después se transfirió mediante recombinación en un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una etiqueta 6 His de forma que se generó una proteína de fusión Ovr107 que tiene una etiqueta 6 His fusionada en su extremo C terminal. El vector resultante se usó para transformar bacterias DH10Bac para generación del vector de infección mediante transposición. Después se generó baculovirus recombinante mediante transfección de células Sf9 con el vector transpuesto. Ovr107 recombinante se expresó mediante infección de líneas de células Sf9 o Hi5 con las partículas de baculovirus recombinantes amplificadas y recogidas.

15 Células Hi5 infectadas con baculovirus recombinante se recogieron 48 h después de la infección. Las células se lavaron con DPBS y se lisaron en fosfato de sodio 100 mM (5 ml/g células), pH 8,0, que contenía cloruro de sodio 0,4 M, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1% e imidazol 10 mM mediante sonicación. El extracción se incubó con 10 mg de ADNasa a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se centrifugó en un rotor SS-34 a 17.000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró adicionalmente a través de un filtro de 45 nm y se cargó en una
 20 columna 5-ml-Ni-NTA (Qiagen) equilibrada con fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,1, que contenía cloruro de sodio 0,4 M y glicerol al 10% al caudal de 3 ml/min. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna (VC) del mismo tampón de equilibrio y Ovr107 se eluyó mediante aumento gradual de imidazol en el tampón de cloruro de sodio-fosfato (10 CV de 20 mM, 10 CV de 50 mM, 10 CV de 100 mM, 5 CV de 500 mM y 5 CV de 1000 mM). Se recogieron fracciones en 5 ml/tubo y las muestras de las fracciones recogidas se sometieron a SDS-PAGE y análisis de Western para evaluar
 25 la pureza de Ovr107. Las fracciones purificadas se combinaron y se concentraron. Los productos finales se dializaron en PBS.

Secuencia de Aminoácido de Ovr107 con Etiqueta HA (SEC ID N°: 12)

MNRTWPRRIWGSSQDEAELIREDIQGALHNYRSGRGERRAAALRATQEELQRDRSPAETPPLQRRPSVRAV
 ISTVERGAGRGRPQAKPIPEAEEAQRPEPVGTSNADSASPD LGPRGPD LVVLQAEREVDIILNHVFDDVESF
 VSRLQKSAEAAARVLEHREGRRRSRRRAAGEGLLTLRAKPPSEAEYTDVLQKIKYAFSLLARLRGNIADPSSP
 ELLHFLFGPLQMI VNTSGGPEFASSVRRPHLTSDAVALLRDNVTRENELWTS LGDSWTRPGLELSPEEGPP
 YRPEFFSGWEPPVTD PQSRAWEDPVEKQLQHERRRRQOSAPQVAVNGHRDLEPESEPLESETAGKWVLCNY
 DFQARNSSSELSVKQRDVLEVLDDSRKWKVVRDPAGQEGYVPYNI LTPYPGPRLLHHSQSPARSLNSTPPPPPA
 PAPAPPPALARPRWRDRPRWDSCDSLNGLDPSEKEKFSQMLI VNBELQARLAQGRSGPSRAVPGFRAPEPQLS
 PGSDASEVRAWLQAKGFSSGTVDALGVLTGAQLFSLQKEELRAVSP EEGARVYSQVTVQRSLLEDKEK VSEL
 EAVMEKQKKKVEGEVEMVIDPAFLYKVVWRWAHHHHHH

Generación de líneas de células de ratón LMTK estables

5 Un vector de mamífero que codifica un Ovr110 marcado con HA se transfectó en células LMTK de ratón. Los
 transfectantes estables se seleccionaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)/FBS al 10%, con
 blastocidina a 10 µg/ml durante 7-10 días, seguido por clasificación de células únicas (Coulter Elite, Beckmann
 Coulter, Sunnyvale, CA) en base a la fluorescencia, a 1 célula/pocillo en placas de 96 pocillos. Las células LMTK
 transfectadas se cultivaron en placas de 96 pocillos (VWR, Brisbane, CA), se expandieron en placas de 24 pocillos y
 posteriormente en placas de 6 pocillos. Después de una semana en cultivo, los clones individuales se ensayaron
 10 para determinar la expresión de Ovr110 mediante transferencia de Western usando anticuerpo anti-HA (Covance,
 Richmond, CA). Dos clones de células LMTK que expresan el nivel más elevado de Ovr110-HA se expandieron en
 matraces de 75 cm² (VWR) para seleccionar hibridomas, se criopreservaron en suero fetal bovino (FBS) con DMSO
 al 10% y se almacenaron en nitrógeno líquido a -196 °C para asegurar el mantenimiento de cultivos de clones
 viables.

Secuencia de Aminoácidos de Ovr110-HA (SEC ID N°: 13)

	1	11	21	31	41	51	
1	MLQNSAVLLV	LVISASATMA	SLGQILFWSI	ISITIIILAGA	IALIIGFGIS	GRHSITVTTV	60
61	ASAGNIGEDG	IQSCTFEFDI	KLSDIVIQWL	KEGVLGLVHE	FKEGKDELSE	QDEMFRGRTA	120
121	VFADQVIVGN	ASLRLKINVQL	TDAGTYKCYI	ITSKGKGNAN	LEYKTGAFSM	PEVNVNDYNAS	180
181	SETLRCEAPR	WFPQPTVVA	SQVDQGANFS	EVSNTSFELN	SENVTMKVVS	VLYNVTINNT	240
241	YSCMIENDIA	KATGDIKYTE	SEIKRRSHLQ	LLNSKASLCV	SSPFAISWAL	LPLSPYLMLK	300
	<u>YPYDVPDYA*</u>						

* secuencia de etiqueta HA

15 **Generación de células transfectadas 293F transitorias**

Una molécula de ácido nucleico que codifica Ovr110 (SEC ID N°: 13), sin la etiqueta HA se clonó en el vector de
 expresión de mamíferos, PCDNA3.1 y el vector recombinante se usó para transfectar células 293F humanas
 (Invitrogen). Cincuenta ml de células 293F cultivados en medio freestyle (GIBCO) a 10⁶ células/ml se transfectaron
 usando reactivo de transfección 293fectin (Invitrogen), de acuerdo con las directrices del fabricante. El ADN, las
 20 células y 293fectin se mezclaron en medio OPTI-MEM (GIBCO). Las células se usaron para análisis 48 h después
 de la transfección.

Inmunización

Para la fusión de MAb de serie A, se inmunizaron ratones con proteína recombinante Ovr110B soluble, que
 corresponde al dominio extracelular de la proteína nativa, con el fin de generar MAb de utilidad tanto terapéutica *in*
 25 *vivo* como de diagnóstico. Para la fusión de MAb de serie C, los ratones se inmunizaron con el dominio extracelular
 expresado de mamífero. Grupos de 8 ratones BALB/c se inmunizaron por vía intradérmica en ambas almohadillas
 plantares traseras. Todas las inyecciones fueron de 25 ul por pata. La primera inyección (día 1) de 10 ul de antígeno
 por ratón fue en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) mezclada en una proporción igual de
 volumen a volumen con adyuvante Titermax gold (Sigma, Saint Louis, MS). Inyecciones posteriores de 10 ug de
 30 antígeno por ratón se realizaron los días 5, 9, 12, 16, 19, 23, 26, 29, 30 y consistieron en antígeno en 20 ul de DPBS
 más 5 ul de adyuvante Adju-phos (Accurate Chemical & Scientific Corp. Westbury, NY) por ratón. La inyección de
 refuerzo final el día 33 consistió en antígeno diluido en DPBS en solitario. La fusión ocurrió el día 37.

Fusión de Hibridoma

5 Los ratones se sacrificaron a la finalización del protocolo de inmunización y se recogió tejido de ganglio linfático (poplíteo) por drenaje mediante disección estéril. Las células de ganglio linfático se dispersaron mediante presión a través de un tamiz estéril en DMEM y retirando las células T a través de perlas magnéticas revestidas con anti-CD90 (Thy1.2) (Miltenyl Biotech, Baraisch-Gladbach, Alemania).

10 Estas células de ganglio linfático enriquecidas con células B primarias después se inmortalizaron mediante electro-fusión celular (BTX, San Diego, CA) con la línea de células de mieloma continua P3x63Ag8.653 (Kearney, J.F. y col., J. Immunology 123: 1548-1550, 1979). Las células fusionadas de manera satisfactoria se seleccionaron cultivando en medio de selección que contenía hipoxantina, azaserina (HA) (Sigma) convencional (DMEM/FBS al 10%). Estos cultivos de fusión se distribuyeron inmediatamente, 10 millones de células por placa, en pocillos de placas de cultivo de 96 pocillos. La distribución del cultivo en placas de cultivo de 96 pocillos, inmediatamente a continuación de la fusión, facilitó la selección de una gran diversidad de clones de hibridoma que producían anticuerpos únicos específicos. Los sobrenadantes de los pocillos se exploraron mediante ELISA, para determinar reactividad frente Ovr110B, Ovr110A y no reactividad cruzada con una proteína irrelevante (Ovr107).

15 Los cultivos monoclonales, que consisten en la progenie genéticamente uniforme de células únicas, se establecieron después del procedimiento de selección anterior, mediante la clasificación de células viables únicas en pocillos de dos placas de 96 pocillos, usando citometría de flujo (Coulter Elite). Los cultivos de hibridoma de células B murinas resultantes se expandieron usando técnicas de cultivo de tejido convencionales. Los hibridomas seleccionados se criopreservaron en suero bovino fetal (FBS) con DMSO al 10% y se almacenaron en nitrógeno líquido a -196°C para asegurar el mantenimiento de los cultivos de clones viables.

Exploración y Selección de Hibridomas que Producen Anticuerpo

25 Líneas de células de hibridoma se seleccionaron para la producción de anticuerpo específico de Ovr110 mediante inmunoensayo en fase sólida ligado a enzima (ELISA). Las proteínas Ovr110B u Ovr107 se adsorbieron de forma inespecífica a pocillos de placas de EIA de poliestireno de 96 pocillos (VWR). Cincuenta µl de proteína Ovr110B o conjugado péptido-BSA a 0,91 mg/ml en (DPBS) se incubaron durante una noche a 4°C en pocillos de placas EIA de poliestireno de 96 pocillos. Las placas se lavaron dos veces con solución salina tamponada con Tris con Tween 20 al 0,05%, pH 7,4 (TBST). Los pocillos de las placas después se vaciaron y la capacidad de unión inespecífica se bloqueó llenando completamente los pocillos con TBST/albumina sérica bovina al 0,5% (TBST/BSA) e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Los pocillos de la placa después se vaciaron, se añadieron 50 µl de muestras de medio de cultivo de hibridoma a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a TA. Los pocillos después se lavaron 3 veces con (TBST). Cien µl de anti-IgG de ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Fc) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL), diluidos 1:5000 en TBST/BSA se añadieron después a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a TA. Los pocillos después se lavaron 3 veces con TBST. Cien µl de sustrato de fosfatasa alcalina paranitrofenilfosfato (pNPP) (Sigma) a 1 mg/ml en tampón de dietanolamina 1 M pH 8,9 (Sigma) se añadieron más tarde a cada pocillo y se incubaron durante 20 min a TA. La actividad de fosfatasa alcalina unida se indicó mediante el desarrollo de un color amarillo visible. La reacción enzimática se cuantificó midiendo la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 405 nm. Los cultivos que producen los valores de absorbancia más elevados se eligen para expansión y evaluación adicional.

Selección de ELISA de MAb de Ovr110

40 Después de 2 semanas de cultivo, los hibridomas con sobrenadantes que producen valores de absorbancia de ELISA mayores de 1,0 con Ovr110B y menores de 0,2 con Ovr107, se distribuyeron nuevamente a partir de veinticinco placas de cultivo de 96 pocillos, en placas de cultivo de 96 pocillos nuevas y se cultivaron durante una semana más.

45 Después de una semana adicional de cultivo, 12 hibridomas de la serie A y 15 de la serie C, con sobrenadantes que producen valores de absorbancia de ELISA mayores de 1,0 con Ovr110B (Tablas 1A y 1B) y menores de 0,2 con Ovr107, se seleccionaron para clonación de célula única en placas de cultivo de 96 pocillos, mediante separación celular (Coulter Elite).

ES 2 369 626 T3

TABLA 1A: RESULTADOS DE ENSAYO DE CLONES DE CÉLULA ÚNICA DE MAb DE SERIE A DE Ovr110

Nº de Clon	DO DE ELISA (405 nm) Nº de pocillo original	Nº de pocillo original	Densidad de placa	Extensión (Nº de clones/placa de 96 pocillos)	Procedimiento de siembra en placa	DO de ELISA de Clon de MAb (405 nm)
A7.1	2,3172	1	1 célula/pocillo	3	Separador	3,5388
A7.2	2,1940	3	1 célula/pocillo		Separador	3,7160
A10.1	1,5391	1	1 célula/pocillo	2	Separador	3,1965
A10.2	3,9733	G10	1 célula/pocillo		Separador	2,2502
A13.1	2,0736	2	1 célula/pocillo	18	Separador	3,3627
A13.2	2,0000	3	1 célula/pocillo		Separador	3,5381
A31.1	2,7208	1	1 célula/pocillo	8	Separador	3,6109
A31.2	2,4506	2	1 célula/pocillo		Separador	3,0818
A57.1	2,8313	1	1 célula/pocillo	27	Separador	3,6099
A57.2	2,7821	3	1 célula/pocillo		Separador	3,9733
A72.1	2,6737	1	1 célula/pocillo	13	Separador	3,6999
A72.2	2,6059	5	1 célula/pocillo		Separador	4,0000
A77.1	1,6650	1	1 célula/pocillo	2	Separador	1,5370
A77.2	1,8328	4	1 célula/pocillo	3	Separador	1,6186
A102.1	2,1280	2	1 célula/pocillo	4	Separador	1,1054
A102.2	1,4710	3	1 célula/pocillo		Separador	1,0121
A87.1	2,1396	3	1 célula/pocillo	13	Separador	1,8355
A87.2	1,9965	4	1 célula/pocillo		Separador	1,9795
A89.1	3,0326	7	1 célula/pocillo	16	Separador	1,9081
A89.2	3,0013	8	1 célula/pocillo		Separador	1,9666
A99.1	3,2165	2	1 célula/pocillo	4	Separador	1,8815
A99.2	3,4925	4	1 célula/pocillo		Separador	2,0927

TABLA 1B: RESULTADOS DE ENSAYO DE CLONES DE CÉLULA ÚNICA DE MAb DE SERIE C DE Ovr110

Nº de Clon	Procedimiento de siembra en placas	Densidad de placa	DO de ELISA
C1	separador	1 célula/pocillo	Sin positivos
C3.2	separador	1 célula/pocillo	1,9884
C4	separador	1 célula/pocillo	Sin positivos
C5.3	separador	5 células/pocillo	2,0032
C6.3	separador	1 célula/pocillo	1,9797
C7.1	separador	1 célula/pocillo	2,0218
C8	separador	1 célula/pocillo	Sin positivos
C9.1	separador	1 célula/pocillo	2,5158
C10.1	separador	1 célula/pocillo	2,1172
C11.1	separador	5 células/pocillo	2,3633
C12.1	separador	5 células/pocillo	2,5522
C13	separador	1 célula/pocillo	Sin positivos
C14	separador	1 célula/pocillo	Sin extensión
C16.1	separador	1 célula/pocillo	2,0682
C17.1	separador	1 y 5 células/pocillo	1,7183

Resultados de exploración de ELISA de MAb de Ovr110 clonados

Después de 2 semanas de cultivo, los sobrenadantes de 2 clones de hibridoma de cada hibridoma parental se ensayaron para determinar la producción de valores de absorbancia de ELISA mayores de 1,5 con péptidos Ovr110B (Tablas 1A y B) u Ovr110 y menores de 0,2 con Ovr107. Los clones Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1, Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89.1, Ovr110.A99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107.1, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1 y Ovr110.C17.1 todos se seleccionaron para aumento de escala para ensayo inmunohistoquímico, de inmunofluorescencia y ensayos funcionales.

10 Exploración de FACS para determinar unión a superficie celular de MAb de Ovr110

Transfectantes estables LMTK-Ovr110-HA y líneas de células de tumor positivas de ARNm de Ovr110 (SKBR3) y negativas de ARNm (HT29) se cultivaron en DMEM + FBS al 10% + P/S. Un día antes de la tinción, las células transfectadas estables LMTK-Ovr110-HA se estimularon añadiendo butirato de sodio hasta una concentración final de 5 mM. Para análisis de FACS, las células LMTK-Ovr110-HA o las líneas de células de tumor se lavaron una vez con 10 ml de DPBS sin $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ y después se añadieron 7 ml de CellStripper tibio (37°C) (Mediatech, Hemdon, VA) por matraz de 150 cm². Después las células se incubaron durante 5 minutos a 37°C con golpeteo del matraz para retirar las células unidas estrechamente. Las células después se retiraron y pipetearon varias veces para romper los agregados, después se colocaron inmediatamente en DMEM/FBS al 10%/butirato de sodio 5 mM. Después las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1300 rpm y se resuspendieron en DMEM/FBS al 10%/butirato de sodio 5 mM. Las células se incuban a 37°C durante un período de recuperación de 30 min. Antes de la tinción, la viabilidad de las células se midió usando Guava Viacount (Guava Cytometers, City, CA) y si > el 90% era viable las mismas se distribuyeron en placas con fondo en V de 96 pocillos (VWR) para tinción con MAb.

Las células se distribuyeron en alícuotas a $0,5-1,0 \times 10^6$ células/pocillo en placas de fondo en V de 96 pocillos y se centrifugaron durante 2 minutos a 1500 rpm. Los sobrenadantes se aspiraron y las placas se agitaron brevemente en un mezclador vorticial para resuspender las células, después se añadieron 200 ul de DPBS/FBS al 3%/Na azida al 0,01% (tampón FACS) a cada pocillo. La centrifugación y la aspiración se repitieron, después se añadieron 25 ul de diluciones secuenciales de sobrenadante de hibridoma o MAb purificado a las células. Las placas se almacenaron en hielo durante 15 min, después se lavaron y centrifugaron como anteriormente, en 200 ul de tampón FACS. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces y después se añadieron 25 ul de anticuerpo Fc anti-IgG de ratón de burro conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA) a las células. Después de 15 minutos en hielo las células se lavaron dos veces, como anteriormente y después se resuspendieron en 250 ul de tampón FACS para análisis en el separador de células o citómetro de flujo. En determinados casos, para almacenamiento durante una noche a 4°C antes del análisis, se añadieron 133 ul de tampón FACS y 67 ul de paraformaldehído al 1%/DPBS a cada pocillo, para fijación, después el volumen se aumentó hasta 250 ul con DPBS. Las células teñidas se analizaron en un separador de células activadas por fluorescencia Elite (FACS) (Beckman Coulter, Miami, FL).

Los resultados de un experimento representativo que demuestra la expresión en la superficie celular mediante análisis de FACS se representan en la Figura 1. La unión del Ovr110 MAb A7.1, seguida por la unión del conjugado de anti-IgG de ratón de burro-PE (DAMPE) dio como resultado el 49% de células LMTK de ratón transfectadas con Ovr110 que eran positivas, con una intensidad de fluorescencia (intensidad de fluorescencia media, IFM) 7,5 veces más elevada que las células teñidas con DAMPE en solitario. Los datos de análisis de FACS adicionales con líneas de células de tumor humano se presentan en la Tabla 2 más adelante. Como se puede observar a partir de los resultados, Ovr110.C3.2, Ovr110.C5.3 y Ovr110.C6.3 cada uno se unió a más del 80% de las células SKBR3 positivas a ARNm de Ovr110 frescas, mientras que el control negativo MAb Pro104.D9.1 se unió a menos del 2% de estas mismas células obtenidas de cáncer mamario. Ovr110.C3.2, Ovr110.C5.3 y Ovr110.C6.3, se unieron de forma similar a menos del 2% de las células negativas a ARNm de Ovr110 de la línea de célula de cáncer de colon HT29.

TABLA 2: UNIÓN DE MAb Ovr110 A LÍNEA DE CÉLULAS DE CÁNCER MAMARIO SKBR3 VIABLES

Clon de MAb	SKBR3		HT29	
	% de Células positivas	IFM	% de Células positivas	IFM
Ninguno	3,2	0,35	1,4	0,316
Ovr110.A57.1	9,8	0,82	1,2	0,385
Pro104.D9.1	1,9	0,395	1,3	0,354
Ovr110.C1	1,9	0,413		
Ovr110.C3	83,8	4,08	2	0,373
Ovr110.C4	17,8	0,971	0,8	0,331
Ovr110.C5	86,5	4,34	1,5	0,356
Ovr110.C6	89,1	4,73	1,7	0,37
Ovr110.C7	5,2	0,641		
Ovr110.C8	1,6	0,394		
Ovr110.C9	22,3	0,936	1,5	0,342
Ovr110.C10	4,9	0,605		
Ovr110.C11	2,3	0,442		
Ovr110.C12	9,4	0,778	4,7	0,4
Ovr110.C13	1,6	0,399		
Ovr110.C14	70,3	2,77	0,9	0,358
Ovr110.C16	3,4	0,479		
Ovr110.C17	63,6	2,4	1,3	0,342

Isotipos de MAb de Ovr110

5 Los isotipos de los MAb se determinaron usando kits de ensayo de inmunoensayo de determinación de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón disponibles en el mercado (IsoStrip, Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN). Los resultados de la determinación de isotipos se enumeran en la Tabla 3. Todos los MAb fueron del isotipo IgG₁/κ, excepto Ovr110 MAb A10.1, que fue del isotipo IgG_{2b}/κ.

TABLA 3: ISOTIPOS DE MAb DE Ovr110

Clon	Isotipo
A7.1	IgG1: Kappa
A10.1	IgG2 _b : Kappa
A13.1	IgG1: Kappa
A31.1	IgG1: Kappa
A57.1	IgG1: Kappa
A72.1	IgG1: Kappa
A77.1	IgG1: Kappa
A87.1	IgG1: Kappa
A89.1	IgG1: Kappa
A99.1	IgG1: Kappa

(continuación)

Clon	Isotipo
A102.1	IgG1: Kappa
A107.1	IgG1: Kappa
C3.2	IgG1: Kappa
C5.3	IgG1: Kappa
C6.3	IgG1: Kappa
C7.1	IgG1: Kappa
C11.1	IgG1: Kappa
C12.1	IgG1: Kappa
C17.1	IgG1: Kappa

Análisis de afinidad de MAb de OVR110

5 La cinética de unión y las constantes de afinidad se calcularon a partir de mediciones de resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE 3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Los experimentos se diseñaron para generar de forma simultánea valores de constante de asociación, constante de disociación y de afinidad para los MAb de Ovr110.

10 El anticuerpo Fc anti-IgG de ratón de conejo (Biacore) se inmovilizó en celdas de flujo 2, 3 y 4 de una microplaca sensora CM5 (Biacore) mediante acoplamiento a amina convencional (Biacore). Se usó una celda de flujo como una superficie de blanco para sustracciones de referencia y se activó y después se inactivó con etanolamina. Los MAb de Ovr110 se capturaron en la microplaca revestida con Fc anti-IgG de ratón de conejo, seguido por unión del antígeno. Por lo tanto, estas mediciones deben representar afinidades 1:1 reales y no efectos de avidéz que se observan con inmovilizaciones de antígeno directas, debido a la naturaleza divalente de los anticuerpos de IgG. Los MAb se diluyeron en tampón HBS EP (Biacore) hasta 15 mg/ml y se dividieron en múltiples tubos para minimizar la evaporación entre ciclos. Los MAb se pasaron a través de las celdas de flujo durante 2 minutos a 20 µl/minuto. El nivel de captura de MAb varió entre 200 y 300 unidades de respuesta (UR) por celda de flujo. A continuación de la captura de MAb se permitió que la superficie se estabilizara durante 3 minutos. Después el antígeno Ovr110B (1,56 mg/ml) se dejó fluir sobre los MAb capturados a 20 ul/minuto en celdas de flujo y a través de la celda de flujo de blanco, durante 4 minutos, en concentraciones sucesivas de 144, 72, 36, 18, 9, 4,5 ul/ml. Debido a que el peso molecular de Ovr110B es 35 kD estas concentraciones de antígeno corresponden a 4,11, 2,06, 1,03, 0,514, 0,257 y 0,129 µM. Se realizaron dos ciclos de replicación para cada concentración de antígeno o tampón. Se permitió un tiempo de disociación de 420 segundos entre ciclos y la regeneración de la superficie de la microplaca al anticuerpo Fc anti- IgG de ratón o la superficie del blanco, se realizaron haciendo fluir glicina 100 mM pH 1,75 a través de las celdas de flujo durante 30 segundos a 100 ul/minuto.

25 Los datos resultantes se analizaron mediante software BiaEvaluation (Biacore) usando un ajuste global simultáneo ka/kd asumiendo unión de Langmuir. El parámetro Rmax del software se ajustó a local para permitir la compensación de variaciones menores en la etapa de captura de Fc anti-IgG de ratón. Las afinidades calculadas presentadas en la Tabla 4, que están en el intervalo de 10⁻⁹ a 10⁻¹³ M, son suficientemente elevadas para conseguir una dosis terapéutica *in vivo* a menos de o igual a 10 mg/kg.

30 TABLA 4: AFINIDADES DE MAb DE Ovr110

	Afinidad			
MAb	KD(M)	KA (MS)	kd(1/s)	ka (1/Ms)
A72.1	1,68E-09	8,17E+08	1,35E-05	1,36E+04
A57.1	1,95E-09	5,5E+08	1,61E-05	8,86E+03
A7.1	9,51E-13	1,14E+12	8,00E-09	9,12E+03

Transferencias de Western

Extractos de proteína para análisis de transferencia de western se prepararon en tampón de lisis celular (NP-40 al

1%, fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2, cloruro de sodio 150 mM) a partir de transfectantes Ovr110-293T y líneas de células de adenocarcinoma de mamífero. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles NuPAGE 4-Bis-Tris al 12% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en condiciones de desnaturalización en un aparato de gel Novex-XCell II Minicell (Invitrogen, Life Tech) y se transfirieron posteriormente a membrana de PVDF usando un módulo XCell Blot (Invitrogen Life Technologies). A continuación de la transferencia de proteínas, las membranas se bloquearon en reactivo de bloqueo al 1% (Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN) y se incubaron durante una noche a 4°C con anticuerpos primarios purificados (anticuerpos monoclonales Ovr110: A10.2, A13.1, A31.1, A57.1, A72.1, A77.1, A89, A107, C3.2, C5.1, C5.3, C6.3, C7.1, C9.1, C11.1, C12.1 o C17.1) y después con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) y finalmente se visualizaron mediante quimoluminiscencia usando un kit de detección de transferencia de Western de avance ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Los experimentos de desglicosilación se realizaron en extractos de proteína a partir de transfectantes Ovr110-293T, líneas de células de adenocarcinoma de mamífero positivas a ARNm de Ovr110 (QPCR +) y negativas a ARNm de Ovr110 (QPCR-) y tumores ováricos usando Peptide N-Glycosidase F (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las muestras desglicosiladas después se analizaron mediante transferencias de western como se ha descrito anteriormente. En resumen, 100 µg de extracto de proteína se desnaturalizaron en tampón de desnaturalización de glicoproteína (SDS al 0,5% + agente reductor) a 100°C durante 10 min. Esto se siguió por la adición de tampones de reacción de kit a una concentración final de NP-40 al 1% y fosfato de sodio 50 mM antes de la adición de 100 unidades de PNGase F y se incubaron a 37°C durante 4 horas.

TABLA 5A: RESULTADOS DE TRANSFERENCIAS DE WETERN USANDO MAB DE OVR110 CON EXTRACTOS A PARTIR DE CÉLULAS 293T TRANSFECTADAS Y LÍNEAS DE CÉLULAS DE CÁNCER MAMARIO, OVÁRICO Y DE COLON.

	A10.1	A13.1	A72.1	A31.1	A57.1	A77.1	A89	A107	
Ovr110-HA-293T	+ Bandas múltiples banda principal a 49-60 kDa y banda menor a ~30 kDa	+ Bandas múltiples banda principal a 49-60 kDa y banda menor a ~30 kDa	+ Bandas múltiples banda principal a 49-60 kDa y banda menor a ~30 kDa	+ Bandas múltiples banda principal a 49-60 kDa y banda menor a ~30 kDa	+ Bandas múltiples banda principal a 49-60 kDa y banda menor a ~30 kDa	+ Bandas múltiples banda principal a 49-60 kDa y banda menor a ~30 kDa	+ Bandas múltiples banda principal a 49-60 kDa y banda menor a ~30 kDa	+ Bandas múltiples banda principal a 49-60 kDa y banda menor a ~30 kDa	+ Bandas múltiples banda principal a 49-60 kDa y banda menor a ~30 kDa
Ovr110-HA-293T Desglicosilado					Banda principal a ~30 kDa Banda menor a ~16 kDa				
MCF7 & SKBR3 (QPCR+)	Débil 50-60 kDa	++ 50-60 kDa	++++ 50-60 kDa	+++ 50-60 kDa	++++ 50-60 kDa	Débil 50-60 kDa	++ 50-60 kDa	+ 50-60 kDa	
MCF7 & SKBR3(QPCR +) Desglicosilados					~30 kDa				
CaOV3&HT29 (PCR-)	-	-	-	-	-	-	-	-	

25 Los resultados de los experimentos de transferencia de western se resumen en las Tablas 5A y 5B. Como se puede

5 observar, los MAb de Ovr110 A10.1, A13.1, A31.1, A57.1, A72.1, A77.1, A89, A107, C3.2, C5.1, C5.3, C6.3, C7.1, C9.1, C11.1, C12.1 y C17.1 identificaron bandas menores del tamaño pronosticado para la proteína Ovr110 no glicosilada (30 kDa) y bandas mayores a 49-60 kDa, en lisados de células 293T humanas transfectadas con Ovr110. Las bandas más grandes eran consistentes con la presencia de varios sitios de glicosilación en la proteína Ovr110.

10 Las bandas de 50-60 kDa también se detectaron mediante los mismos MAb de Ovr110, en lisados a partir de las líneas de células de cáncer mamario humano QPCR + SKBR3 y MCF7 (ATCC, Manassas, VA), pero no se detectaron en lisados a partir de las líneas de células QPCR - CaOV3 y HT29 (ATCC). La desglicosilación con PNGasa redujo el tamaño de las bandas detectadas por MAb Ovr110 A57.1 desde ~ 60 kDa (glicosilado) hasta ~ 30 kDa (tamaño no glicosilado pronosticado), en lisados a partir de células de 293T humanas transfectadas con Ovr110 y en lisados a partir de las líneas de células de cáncer mamario SKBR3 y MCF7 (ATCC). La desglicosilación de lisados de 3 muestras de tumor ovárico con PNGasa F también redujo el tamaño de las bandas detectadas por MAb Ovr110 57.1 desde ~ 60 kDa (glicosilado) hasta ~ 30 kDa.

TABLA 5B: RESULTADOS DE TRANSFERENCIAS DE WESTERN USANDO MAB DE OVR110 CON EXTRACTOS DE LÍNEAS DE CÉLULAS DE CÁNCER MAMARIO Y DE COLON

	C3.2	C5.1	C5.3	C6.3	C7.1	C9.1	C11.1	C12.1	C17.1	A57.1
SKBR3 (QPCR +)	+ 50kDa & débil 30 & 60kDa	+ 50 kDa & 30 & 60 kDa	+ 50 kDa & bandas débiles a débil 30 & 60 kDa	+ 50 & 62 kDa & banda débil a 30 kDa	+ 50 kDa & bandas débiles a 30 & 60 kDa	++ 50 kDa & bandas débiles a 30 & 60 kDa	++ 50 kDa & bandas débiles a 30 & 60 kDa	++ 50 kDa & bandas débiles a 30 & 60 kDa	+ 50 kDa & bandas débiles a 30 & 60 kDa	++ 50-60 kDa & banda menor a ~30 kDa
HT29 (QPCR-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

15 **Ejemplo 2: Unión a superficie de células de MAb de Ovr110 en células de cáncer vivas demostrada mediante inmunofluorescencia**

Las siguientes líneas de células de cáncer se usaron en el presente estudio: OvCar-3 ovárico, CaOV-3 ovárico y SKBr-3 mamario. Las células OvCAR-3 y SKBR-3 pero no las células CaOV-3 de control expresan Ovr110.

20 Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 18 mm y se cultivaron a 37°C en DMEM que contenía a suero fetal bovino al 10% y penicilina y estreptomycin durante 48 h antes de tratamiento con MAb anti-Ovr110.

25 Once MAb de Ovr110 (Ovr110.A7.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A72.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89.1, Ovr110.A99.1, Ovr110.A102.1 y Ovr110.A107.1) se ensayaron para determinar qué anticuerpo se une a la superficie celular de células de cáncer que expresan Ovr110. Se añadieron MAb primarios al medio a una concentración final de 10 µg/ml y se incubaron durante 1 hora a 37°C. A continuación de la fijación con formaldehído al 3% en solución salina tamponada con fosfato (PBS), las células se incubaron con un anti-ratón de burro marcado con Cy3 secundario (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) a una concentración de 10 µg/ml durante 30 min. A continuación del lavado, las células se montaron en un medio que contiene DAPI (Vectastain, Vector, Burlingame, CA) para visualizar los núcleos celulares y proporcionar una tinción de contraste y se observaron en un Zeiss Fluorescence Microscope Axiophot provisto de filtros fluorescentes apropiados. Se obtuvieron microfotografías con una cámara CCD.

Resultados

35 De los once MAb ensayados (Ovr110.A7.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A72.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89.1, Ovr110.A99.1, Ovr110.A102.1 y Ovr110.A107.1), diez anticuerpos fueron capaces de unirse a al menos una parte de las células que expresan Ovr110. La Figura 2 muestra la unión de Ovr110.A57.1 a la membrana celular de células de cáncer ovárico OvCAR-3 (flechas en A) y células de cáncer mamario SKBR-3 (flechas en B). La membrana celular de las células CaOV-3, una línea de células de control que no expresa Ovr110, no estaba marcada cuando las células se incubaron con el mismo anticuerpo (Fig. 2C).

Unión e internalización en células de cáncer vivas

40 El presente estudio se realizó usando anticuerpos fluorescentes. Mediante la marcación de anticuerpos con el colorante fluorescente Cy3, la unión e internalización de anticuerpos se puede visualizar mediante microscopía de

fluorescencia. La tecnología está bien establecida. Las células OvCAR-3 que no expresan Ovr110 se usaron como controles negativos.

Conjugación con Cy3

5 Ovr110.a7.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A72.1, Ovr110.A57.1 y Ovr110.A87.1 se marcaron con Cy-3. La conjugación con Cy3 se realizó de acuerdo con procedimientos convencionales y las directrices del fabricante. En resumen, 1 mg de anticuerpo se dializó frente a tampón de bicarbonato 0,1 M (pH 9,3) durante 60 min, se mezcló con colorante Cy3 y se incubó a TA durante 2 h y después se transfirió en un casete de diálisis Pierce Slide-A Lyzer para diálisis en 2 litros de PBS durante 6 h a 4 °C. La operación se repitió 6 veces. Los anticuerpos conjugados con Cy3 se recuperaron y la concentración se midió en un espectrómetro a 280 nm.

10 Los MAb Ovr110.a7.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A72.1, Ovr110.A57.1 y Ovr110.A87.1 después se incubaron a una concentración de 10 µg/ml con las células a 37°C en una cámara de agua durante 60 min, se lavaron en PBS y se fijaron con formaldehído al 3% en PBS durante 10 min. A continuación de la fijación, los cubreobjetos con las células se montaron en un medio que contenía DAPI (Vectastain) para visualizar los núcleos celulares y se observaron en un Zeiss fluorescence Microscope Axiophot provisto de filtros fluorescentes apropiados. Se obtuvieron micrografías con una cámara CCD a color.

Resultados

La microscopía de inmunofluorescencia de células de cáncer tratadas con Cy3-Ovr110.A7.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A72.1, Ovr110.A57.1 y Ovr110.A87.1 indicó que las células de cáncer que expresan Ovr110 se unen e internalizan los anticuerpos fluorescentes a diversos alcances. La Fig. 3A (flechas) muestra que a continuación de la unión CY3 Ovr110.A57.1 se internaliza por las células SKOV-3 y a un grado menor por las células SKBr-3 (Fig. 3B). No se observó o se observó unión baja de Cy3-Ovr110.A57.1 en las células de control CaOV-3 (Fig.3C). La tinción de patrón de internalización en las células SKOV-3 estaba caracterizada por la presencia de vesículas perinucleares que probablemente corresponden a endosomas localizados en la proximidad del aparato de Golgi (Fig. 3A y B).

Conclusiones

25 Los MAb de Ovr110 se internalizan *in vitro* tras la unión a Ovr110 en la superficie de las células de células de cáncer que expresan Ovr110.

Distribución de Ovr110 en tumores y tejidos normales evaluada mediante inmunohistoquímica

Tejidos

30 Bloques incrustados en parafina fijados con formalina de tejidos de cáncer mamario, ovárico y adyacentes normales se obtuvieron a partir de National Research Interchange (Filadelfia, PA). Los bloques incrustados OCT de órganos normales se obtuvieron en Zoion (Hawthorne, NY).

Tinción inmunohistoquímica para cortes incrustados en parafina fijados con formalina

35 Cortes de seis µm de espesor cortados a partir de bloques incrustados en parafina fijados con formalina se hornearon a 45°C, se desparafinaron en Histoclear y se rehidrataron a través de una serie de etanol hasta PBS. La recuperación de antígeno se realizó sometiendo a ebullición los portaobjetos de cortes en tampón de citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) a 120°C, 103,42 ~ 117,21 Kpa en cámara de recuperación (Biocare, Walnut Creek, CA) durante 10 min. La actividad de peroxidasa endógena se detuvo mediante tratamiento con solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 min. Los portaobjetos se incubaron con BSA al 1% para bloquear la unión a anticuerpo inespecífica y después se sometieron a reacción con 6 MAb de Ovr110 primarios diferentes usados a una concentración de 1 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente en un autostainer DAKO (Dako Co., Carpinteria, CA). Después de lavar en solución salina tamponada con Tris (TBS) con Tween-20 al 0,5%, los portaobjetos se incubaron con anti-IgG de ratón y el anticuerpo secundario se conjugó a peroxidasa de rábano picante (HRP). Después del lavado en TBS con Tween-20 al 0,5%, los cortes se visualizaron mediante 3,3'-diaminobenzidina cromagen durante 2 ~ 5 minutos (Immunovision Technologies, Co. Daly City, CA) y se tiñeron con contraste con hematoxilina antes de montar en medio Permout después de la deshidratación. La IgG de ratón normal en la misma concentración que el anticuerpo primario sirvió como controles negativos.

Tinción inmunohistoquímica para cortes no fijados congelados incrustados en OCT

50 Los portaobjetos se cortaron en la criocámara a 5-8 µm a una temperatura apropiada, se secaron al aire durante un mínimo de ½ hora a temperatura ambiente. Se realizó IHC usando el Kit Immunovision Powervision (Immunovision Technologies Co. Daly City, CA). En resumen, los portaobjetos se enjuagaron con TBS para eliminar el OCT y se incubaron con el anticuerpo primario Ovr110.A13.1 y Ovr110.A57.1 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se fijaron posteriormente en fijador paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y se trataron como se ha descrito anteriormente.

Resultados

Ovr110.a7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A57.1 y Ovr110.A87.1 se usaron para inmunomarcaje de cortes de muestras clínicas de adenocarcinoma seroso ovárico. La Figura 4 muestra la distribución de Ovr110 en tumores ováricos evaluada por IHC usando Ovr110.A57.1.

- 5 Trece de las quince muestras clínicas (87%) mostraron inmunomarcaje positivo usando Ovr110.A57.1 mientras que catorce de quince (93%) fueron positivos usando Ovr110.A13.1 (Tabla 6A). La inmunotinción específica estuvo limitada a células epiteliales en los tumores y el número de células positivas varió entre el 50% hasta casi todas las células tumorales. La Fig. 4A y la Fig. 4B muestran que las células epiteliales del tumor presentaron una tinción de membrana marcada (flechas) con una tinción citoplasmática menos intensa y sin tinción de fondo en el estroma. La Fig. 4C muestra carencia de marcación específica en un experimento de control en el que el anticuerpo primario se reemplazó con una fracción de IgG de ratón.

- 10 Ocho de diez (80%) muestras clínicas de cáncer mamario fueron positivas cuando se usó Ovr110.A57.1 mientras que cinco de diez (50%) fueron positivas usando Ovr110.A13.1 (Tabla 6A). La Fig. 5 muestra el patrón de expresión en muestras clínicas de carcinoma ductal infiltrante mamario. La marcación estuvo limitada a la superficie celular de las células epiteliales de los tumores (Fig 5A y B, flechas). La Fig. 5C muestra la ausencia de marcación específica en un experimento de control en el que el anticuerpo primario se reemplazó con una fracción de IgG de ratón. Como se puede juzgar por la intensidad de la inmunomarcación, el nivel de expresión de Ovr110 en los tejidos neoplásicos ovárico y mamario fue elevado. Se investigó un número limitado de muestras de cáncer pancreático para la expresión de Ovr110. Dos de cuatro muestras clínicas (50%) mostraron expresión de Ovr110 con Ovr110.A57.1 y tres de cinco con Ovr110.A13.1 (Tabla 6A). La Fig. 6A y B muestra el patrón de inmunomarcación obtenido usando Ovr110.A57.1 en muestras clínicas de adenocarcinoma pancreático. El marcaje se limita a la superficie celular de las células epiteliales (flechas). No se observó marcación específica cuando se usó IgG de ratón normal en lugar de Ovr110.A57.1. Los tejidos de cáncer pulmonar también se observó que eran positivos para inmunomarcación con A7.1, A13.1 y A31.1 (2/2, 2/3 y 1/2 casos respectivamente).

- 15 La expresión de Ovr110 también se analizó en tejidos normales y en general se observó que era negativa en los siguientes órganos: hígado, estómago, vejiga, testículo, colon, ovario, próstata y pulmón (1/7 positivo únicamente con A13.1). Las células de corazón normal mostraron tinción citoplasmática moderada pero no tinción de superficie celular. El riñón mostró tinción membranosa moderada de algunos túbulos contorneados distales y el bucle ascendente. La membrana apical de los ductos mamario y pancreático normales también se marcó.

- 20 25 30 Tabla 6A: Resumen de resultados de inmunohistoquímica que muestran el número de casos positivos en muestras de tejido humano normal y muestras clínicas de cáncer ovárico, mamario y pancreático.

MAB	O C	O N	B C	B NAT*	B N	P C	P N	L C	L N
A7.1	12/15	0/3	2/2	NA	2/5	2/2	2/3	2/2	0/5
A13.1	14/15	0/3	5/10	2/2	3/8	3/5	0/3	2/3	1/7
A31.1	1/2	0/2	1/2	NA	1/5	0/2	0/3	1/2	0/5
A57.1	13/15	0/3	8/10	2/2	2/3	2/4	NA	NA	NA

* NAT = Tejido adyacente normal
 OC= cancer ovárico; ON= ovario normal; BC= cancer mamario; BNAT= NAT mamario; BN= mamario normal; PC= cancer pancreático; PN= pancreático normal; LC= cáncer pulmonar; LN= pulmón normal

Tabla 6b: Unión de MAb de Ovr110 a tejido mamario de ratón adulto normal

MAB	Conc.	Glándula Mamaria			Ganglio linfático en la almohadilla
		Epitelio Ductal	Estroma	Músculo liso	Linfocitos
A57.1	1 ug/ml	3+ C/M*	-	-	Vaso linfático 2+ C
C3.2	1 ug/ml	3+ C	-	-	Algunos 1+ C
C6.3	1 ug/ml	3+ C	-	-	2+ C
C12.1	1 ug/ml	3 + M apical	-	-	-

(continuación)

		Glándula Mamaria			Ganglio linfático en la almohadilla
Controles					
Pro104 D133.1	2 ug/ml	-	-	-	
E-caderina	0,25 ug/ml	3+ M	-	-	-
IgG1	10 ug/ml	-	-	-	-
* Graduación 1-3 + usando escala de Carr, C = citoplasmático y M = membrana					

Debido a que la unión al homólogo de roedor de Ovr110 facilitaría el ensayo de seguridad preclínico para la unión de los MAb anti-Ovr110, se ensayaron varios MAb anti-Ovr110 en tejido mamario de ratón normal que se preparó, seccionó y tiñó de la misma manera que los tejidos humanos normales. Los resultados de estos ensayos se presentan en la Tabla 6B. Ovr110.A57.1, Ovr110.C3.2, Ovr110.C6.3 y Ovr110.C12.1 todos reaccionaron con las células epiteliales ductales en las glándulas mamarias de ratón, en un patrón similar al de los tejidos mamarios humanos normales.

Resumen

Los resultados demuestran que la expresión de Ovr110 se puede usar como un indicador altamente sensible y específico de carcinomas serosos del ovario y carcinoma ductal infiltrante mamario, aunque Ovr110 también se expresó en algunos cánceres pancreáticos y de pulmón y varios MAb anti-Ovr110 aparentemente también reaccionaron con una molécula relacionada en tejido mamario de ratón. El patrón de tinción de membrana celular indica que Ovr110 debería ser una diana terapéutica ideal

Ejemplo 3: Destrucción de células CHO transfectadas con Ovr110 mediante incubación con MAb y conjugado MAb anti-ratón saporina

Se realizaron experimentos incubando células CHO transfectadas con Ovr110 (Ovr110-CHO) con MAb Ovr110 premezclados con un conjugado anti-IgG de ratón de cabra saporina Mab-zap (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) y midiendo la viabilidad celular a 72 y 96 h, para detectar efectos de destrucción potenciales sobre estas células que expresan Ovr110. El día 1 las células Ovr110-CHO se colocaron en placas de cultivo celular estériles de fondo plano de 96 pocillos (Coming), en pocillos por triplicado, a 2000 células/75 ul/pocillo, en medio F12 con FBS al 10%, P/S. Las placas se incubaron a 37°C, en CO2 al 5 %, durante una noche. Se colocaron placas duplicadas para permitir lecturas a 72 h y 96 h. El día 2 (0 h), 25 ul de concentraciones finales de MAb en solitario 4 x o 25 ul l de MAb 4 x premezclados con 25 ul de Mab Zap 4 x, o 25 µl de Mab Zap en solitario 4 x, o 25 ul de medio en solitario se añadieron a pocillos de las placas de 96 pocillos, en triplicado, hasta un volumen final de 100 ul. Las concentraciones de MAb finales fueron 2 ug/ml, 0,4 ug/ml, 0,08 ug/ml y 0 ug/ml y la concentración final de MAb Zap fue 1 µg/ml. Los pocillos triplicados con medio en solitario, MAb en solitario (2 µg/ml únicamente) y MAb Zap en solitario se usaron como controles negativos. El receptor anti-transferrina MAb 5E9 (ATCC, Manassus, VA) se usó como un MAb de control positivo para destrucción. Las placas se agitaron suavemente durante cinco minutos para mezclar los reactivos y después se incubaron a 37°C en CO2 al 5%. El día 5 (72 h), 10 µl de una solución madre de Azul de Alamar (Bisource International, Camarillo, CA) se añadieron a pocillos del primer grupo de placas y las mismas se incubaron a 37°C, en CO2 al 5% durante 2-7 h. Después las placas se analizaron en un espectrofotómetro SpectraMAX GeminiEM (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) (emisión = 590 nm, excitación = 560 nm y punto de corte = 570 nm) y la viabilidad se expresó como un porcentaje de los pocillos de control con medio en solitario.

Tabla 7: Destrucción de Ovr110-CHO mediante MAb Ovr110 y conjugado MAb Zap Saporina

Clon de MAb	% de Ovr110 -CHO Positivo con MAb (IF)*	Porcentaje de Crecimiento en Comparación con Pocillos con Medio en Solitario					
		Ovr110 - CHO MAb (2 ug/ml) + MAb Zap	MAb Zap	MAb (2 ug/ml)	MAb + MAb Zap		
					MAb (0,08 ug/ml)	MAb (0,4 ug/ml)	MAb (2 ug/ml)
5E9	-	93,5	78,0	96,7	66,1	75,8	87,1
A10.1	70	91,9	61,3	101,6	48,4	50,0	45,2

(continuación)

Clon de MAb	% de Ovr110 - CHO Positivo con MAb (IF)*	Porcentaje de Crecimiento en Comparación con Pocillos con Medio en Solitario					
		Ovr110 - CHO MAb (2 ug/ml) + MAb Zap	MAb Zap	MAb (2 ug/ml)	MAb + MAb Zap		
					MAb (0,08 ug/ml)	MAb (0,4 ug/ml)	MAb (2 ug/ml)
A31.1	40	91,2	59,6	96,2	43,1	44,2	43,7
A57.1	40	100,0	57,7	101,9	36,6	36,5	42,3
A87.1	70	92,2	58,8	98,0	45,8	39,2	43,1
C3.2	60	97,0	71,7	98,9	50,9	55,5	56,6
C5.1	40	98,1	73,1	100,0	52,0	50,0	46,9
C5.3	40	96,2	75,0	103,8	57,7	53,8	59,6
C6.3	40	96,2	73,1	100,1	51,9	43,1	50,0
C9.1	20	98,1	78,1	102,6	58,5	80,0	67,9
C11.1	1	98,0	78,4	101,9	58,8	70,6	80,4
C12.1	20	100,0	80,4	103,9	66,7	72,5	78,4

* Microscopía de inmunofluorescencia como se detalla en el Ejemplo 2.

Los resultados de ensayo de Ovr110.A10.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.C3.2, Ovr110.C5.1, Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C9.1, Ovr110.C11.1 y Ovr110.C12.1 se presentan en la Tabla 8. Como se puede observar, el MAb Zap en solitario dio como resultado un fondo elevado e inhibió el crecimiento de las células Ovr110-CHO del 0-41,4%. Este no fue el caso para los pocillos de control negativo con células Pro104-CHO y MAb Zap en solitario, las cuales dieron como resultado el 0-10% de inhibición del crecimiento (datos no mostrados). Sin embargo, ninguno de los MAb Ovr110 en solitario, produjo más del 3,8% de inhibición del crecimiento de células Ovr110-CHO. Mientras que, cuando se añadió conjugado MAb Zap saporina, todos los MAb Ovr110 ensayados produjeron más del 10% más de inhibición del crecimiento que con MAb Zap en solitario.

Ovr110.A57.1 en particular, a concentraciones de 0,08, 0,4 y 2,0 ug/ml, junto con MAb Zap dio como resultado el 15,4-21,1% más de inhibición de crecimiento de células Ovr110-CHO, que MAb Zap en solitario y el 57,7-63,4% de inhibición del crecimiento en comparación con pocillos con medio en solitario. En conclusión, la inhibición del crecimiento de células CHO que expresan Ovr110, se obtuvo a concentraciones de MAb que se pueden conseguir fácilmente *in vivo*, con fines terapéuticos. Estos datos *in vitro* sugieren que los MAb Ovr110 anteriores serían adecuados para dirección de fármaco o isótopos a células tumorales *in vivo*.

Ejemplo 4: Unión de MAb Ovr110 y BTLA-Fc soluble a células T activadas y células tumorales

Los MAb anti-B7x/B7H4 humano y anti-B7S1 de ratón demostraron previamente unirse a Células T activadas (Prasad y col., Immunity 18: 863-73 (2003); Sica y col., Immunity 18: 849-61 (2003); Zang y col., Proc. Nat. 1 Acad. Sci. EE.UU. 100: 10388-92 (2003)). Con el fin de verificar la unión de los MAb Ovr110 de la presente invención a células activadas, células T humanas frescas se purificaron y estimularon con compuestos diferentes, como se ha descrito más adelante. La unión de los MAb Ovr110 a células T CD3 positivas activadas que expresan CD25 (IL-2R) y CD71 (TFR) se analizó mediante FACS. Debido a que BTLA se ha identificado como el receptor putativo de Ovr110 (B7x/B7H4) (Watanabe y col., Nat Immunol. 2003 4: 670-9; Carreño y Collins Trends Immunol. 2003 24: 524-7), también se examinó la unión de la fusión Fc BTLA-IgG2a de ratón humana divulgada en el presente documento a estas células T activadas y células tumorales.

Preparación de leucocitos de sangre periférica humana (PBL)

Sangre periférica humana de donantes macho normales se obtuvo de donantes voluntarios en el centro Stanford Blood (Palo Alto, CA). Se aislaron células mononucleares usando procedimientos de centrifugación en gradiente de densidad de etapa única Ficol/Hypaque convencionales (1,077 g/ml).

Activación de células T

Células mononucleares a una concentración final de 10^6 /ml se cultivaron durante 3 días, a 37°C, en RPMI-1640 (CellGro), complementado con FCS al 10% (Hyclone, Utah), con fitohemaglutinina (PHA-M) (Sigma, St. Louis, MO) en 10 µg/ml o lipopolisacárido (LPS) (Sigma) a 10 µg/ml o una combinación de acetato de oforbol mirístico (PMA)

(Sigma) a 10 ng/ml e ionomicina (Sigma) a 1 μ M, en matraces de cultivo de tejido de 25 cm² convencionales en CO₂ al 10%.

Inmunofluorescencia y citometría de flujo

5 Las células se recogieron después de 3 días de estimulación con PHA y se lavaron exhaustivamente. Las células mononucleares se distribuyeron en una placa de fondo en V de 96 pocillos y se incubaron en suero autólogo para bloquear los receptores de Fc. Se añadió anticuerpo anti-FITC CD3 (Serotec, Raleigh, NC) a cada pocillo y se añadieron CD80PE, CD86PE, CD25PE o anti-CD71 biotinilado (Serotec), Over110.A57.1 u Ovr110.C3.2 como un
 10 segundo MAb, a 20 ug/ml, para análisis de color doble. Las células se lavaron dos veces y se añadió Ficoeritrina-Estreptavidina (PESA) a los pocillos preincubados con MAb biotinilados. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón FACS. Las células se preincubaron en suero autólogo y se tiñeron con proteínas de fusión Ovr110-Ig o BTLA-Ig, a 20 ug/ml. Las células se lavaron dos veces, se añadió anti-PE de ratón de burro (1 μ g/ml) a las muestras y las células después se lavaron dos veces e incubaron en suero de ratón para bloquear sitios de unión libres en el anticuerpo anti-ratón de burro. Después se añadió anticuerpo anti-FITC CD3 como una última
 15 etapa para identificar las células T. Después de lavar dos veces, las células se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron mediante citometría de flujo. La línea de células de tumor humano SKBR3 se incubó con MAb o BTLA-Fc como se ha descrito previamente anteriormente.

Todas las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS Elite. Todos los histogramas se generaron usando el programa Winmdi. Se usaron células T positivas a CD3 como una entrada para analizar la expresión de la familia B7 y los marcadores de activación (CD71 y CD25).

20 TABLA 8A: Unión de MAb anti-Ovr110 a células tumorales y células T activadas

	HT29 (QPCR-)		SKBR3 (QPCR+)		Células T en reposo (0 h)		Células T activadas 72 h con PHA	
	% de Células	IFM*	% de Células	IFM*	% de Células	IFM*	% de Células	IFM*
Control Neg. (Pro104 D9.1)	2	0,5	2	0,6	4	6,4	1	8
CD25					0	7,6	77	19
CD71	100	50	99	217	8	7,6	95	219
A7.1	2	0,5	71	4,2				
A57.1	2	0,6	4	1	6	10	82	246
A72.1	21	1,0	6	1,2				
C3.2	1	0,5	60	3,6	6	10	2	5

* Intensidad de fluorescencia media

TABLA 8B: Unión de MAb anti-Ovr110 a células T activadas con PHA a partir de donantes macho normales

	N	Día 0 % de células Positivas (Promedio \pm Des. Tip.)	N	Día 3 % de células Positivas (Promedio \pm Des. Tip.)
Control Neg.	5	1,8 \pm 1,4	6	1,9 \pm 0,4
CD3+ Total	5	82,6 \pm 14,1	6	92,4 \pm 6,4
Porcentaje de células separadas CD3 positivas				
Ovr110.A57.1+	5	2,8 \pm 1,7	6	57 \pm 34,0
Ovr110.C3.2+	3	3,2 \pm 2,6	5	8,8 \pm 12,4
CD80+	5	1,2 \pm 0,8	6	3,6 \pm 3,1

(continuación)

	N	Día 0 % de células Positivas (Promedio ± Des. Tip.)	N	Día 3 % de células Positivas (Promedio ± Des. Tip.)
CD86+	5	1,4 ± 0,8	6	12,8 ± 11,4
CD25+	5	1,9 ± 1,1	6	86,3 ± 8,1
CD71+	5	7,2 ± 1,0	6	95,9 ± 3,5
Ovr110-Fc	1	0,9	4	82,8 ± 15,9
BTLA-Fc	1	1,4	4	20,2 ± 32,5

TABLA 8C: Unión de MAb anti-Ovr110 a células B activadas, células dendríticas y monocitos

	Porcentaje de células positivas por FACS					
	Células B (CD19+)		Células Dendríticas (CD1c+)		Monocitos (CD14+)	
	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h
MAb						
Control Negativo	1	2	1	1	1	1
Control Positivo	31	22	11	15	94	96
MAb	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h
Ovr110.A57. 1	12	13	26	72	8	22
CD80	16	16	14	2	4	4
CD86	5	27	50	94	70	20
CD25	3	14	2	1	1	2
CD71	61	64#	89	100*	32	72
# Intensidad de fluorescencia aumentó ~ 2 veces en 0 h						
* La intensidad de fluorescencia aumentó 4 veces en 0 h						

5 Como se puede observar en la Fig. 7, donde las curvas llenas representan la unión de MAb a células T no estimuladas, y en las Tablas 8A, 8B y 8C, se consiguió un aumento en la expresión de CD25 y CD71 (es decir, aumento en fluorescencia media de PE) en las células T activadas con PHA (separadas en CD3), en comparación con células T no estimuladas. Un aumento en la expresión de CD71 (es decir, aumento en células positivas o intensidad de fluorescencia) se consiguió en las células dendríticas activadas (separadas en CD1c) y monocitos activados. Estos datos demuestran activación positiva de células T, células dendríticas y monocitos. Los perfiles de fluorescencia en la Fig. 7 y las Tablas 8A, 8B y 8C demuestran que la expresión de CD86 (B7.2) y Ovr110 (MAb A57.1) estuvo aumentada en las células T activadas y células dendríticas activadas y Ovr110 estuvo aumentado de alguna forma en monocitos activados.

15 Como una prueba adicional de que BTLA es el ligando de Ovr110 se ensayó la unión de la proteína de fusión BTLA-Fc (IgG2a de ratón) a células 293F transfectadas con Ovr110 (Ovr110-293F). A partir de la Fig. 7G, 7H y 7I, se puede observar que la proteína de fusión BTLA-Fc se unió significativamente a las células Ovr110-293F (17% de células positivas, IFM 24,57), pero no a las células 293F de control (2% células positivas, IFM 3,44). Además no se observó unión apreciable de la IgG2a de ratón a células Ovr110-293F a través del fragmento Fc (3% células positivas, IFM 4,32). A partir de los datos presentados en la Tabla 8B, la unión de BTLA-Fc y Ovr110-Fc a células activadas y la Fig. 7G, 7H y 7I, la unión de BTLA-Fc a células Ovr110-293F, es evidente que estas dos proteínas recombinantes pueden ser útiles como agentes de diagnóstico o terapéuticos, mediante el bloqueo de la función tumoral. Además, versiones modificadas de BTLA-Fc y Ovr110-Fc conjugadas a, por ejemplo, un componente citotóxico o citostático u otra funcionalidad, también se podría usar como un agente terapéutico.

25 Los datos presentados en Tablas 8A y 8B, demuestran que el MAb A57.1 se une aparentemente preferentemente a las células T activadas y MAb C3.2 se une preferentemente a la línea de células de tumor SKBR3. Estos datos sugieren diferencias entre los epítomos a los cuales se unen estos dos MAb, que pueden ser importantes para

reducir los efectos de supresión inmune de Ovr110 expresado en tumor o desprendido, pero que también puede ser importante para minimizar cualquier efecto inmunosupresor debido al uso de MAb C3.2 como un anticuerpo anti-tumor terapéutico.

Ejemplo 5: validación funcional de Ovr110

5 **Materiales y procedimientos**

Células y cultivo celular

Las líneas de células RK3E, 293T, IEC-18, SKOV3, HeLa, CaOV3, HT29, MCF7 y SKBR3 se adquirieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Las células se cultivaron en DMEM (Invitrogen) con L-glutamina más 4,5 g/l de glucosa y se complementaron con FBS al 10% y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Cellgro). Todas las células se mantuvieron en una incubadora humidificado a 37°C con CO₂ al 5%.

Diseño y Preparación de Oligonucleótido de ARNsi

Para diseñar moléculas de ARNsi, se seleccionaron secuencias a partir de la fase de lectura abierta del ARNm de Ovr110 en base a procedimientos descritos previamente (Elbashir y col., 2001). Una secuencia de ARNsi "desorganizada" aleatoria que no debería generar silenciamiento de ningún ARNm celular conocido se usó como un control negativo. Como un control negativo adicional, se usó ARNsi que se dirigía a Emerina para demostrar que el silenciamiento de un ARNm no esencial no influía sobre los niveles de Ovr110 ni ninguno de los criterios de valoración biológicos (datos no mostrados). Como un control positivo para silenciamiento de un ARNm que conduce a inducción de apoptosis, se usó un ARNsi que se dirige a DAXX, en base a los datos publicados (Michaelson y col., J Cell Sci. 2003 Jan 15; 116(Pt 2): 345-52). Se realizó una búsqueda BLAST frente al genoma humano con cada secuencia de ARNsi seleccionada para asegurar que el ARNsi era específico de diana y que no funcionaba para silenciar otras secuencias. Todas las moléculas de ARNsi (grado purificado de HPP) se sintetizaron químicamente por Xeragon Inc. (Germantown, MD). Los ARNsi se disolvieron en tampón estéril, se calentaron a 90°C durante 1 minuto y después se incubaron a 37°C durante 1 hora antes del uso. Los oligonucleótidos de ARNsi con dos restos de timidina (dTdT) en el extremo 3' de la secuencia consistían en las siguientes secuencias de ARN específicas:

- 25 Ovr110 # 37: sentido 5'-GGUGUUUUAGGCUUGGUCC-3' (SEC ID N°: 14)
- Ovr110 # 39: sentido 5'-CUCACAGAUGCUGGCACCU-3' (SEC ID N°: 15)
- Ovr110 # 41: sentido 5'-GGUUGUGUCUGUCUCUAC-3' (SEC ID N°: 16)
- Emerina: sentido 5'-CCGUGCUCUGGGGCUUGG-3' (SEC ID N°: 17)
- Desorganizada: sentido 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3' (SEC ID N°: 18)
- 30 DAXX: sentido 5'-GGAGUUGGAUCUCUCAGAA-3' (SEC ID N°: 19)

Transfección con Oligonucleótidos de ARNsi

6 X 10⁴ células SKBR3 se sembraron en placas de 12 pocillos durante 18-24 horas antes de transfección. La transfección transitoria se llevó a cabo usando reactivo oligofectamine (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usó una concentración final de ARNsi 100nM (excepto ARNsi de DAXX que fue 200 nM) y 1,5 ul de oligofectamine por pocillo de células. Los ARNsi se transfectaron por triplicado para todos los experimentos. Pocillos paralelos de células se evaluaron 72 horas después de la transfección para determinar cambios en los niveles de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativa (QPCR), cambios en los niveles de proteína mediante inmunotransferencia de Western y cambios en la apoptosis mediante dos sistemas de ensayo diferentes (véase más adelante). Los resultados que demuestran regulación negativa de la proteína Ovr110 se muestran en la Fig. 11. El ARNsi N° 37 frente a Ovr110 también se ensayó con células que no expresan Ovr110 y no hubo efecto sobre la apoptosis (datos no mostrados). Todos los hallazgos se confirmaron con al menos 2 experimentos adicionales.

RT-PCR en Tiempo Real Cuantitativa (QPCR)

Se usó un kit QuantiTech SYBR Green RT-PCR de Qiagen Inc. para evaluación de QPCR. Se usaron entre 20 y 40 ng de ARN de molde por reacción. La QPCR se realizó usando un sistema Taqman 7700 Sequence Detection (Applied Biosystem Inc).

Ensayos de Apoptosis

Se usaron dos kits de ensayo diferentes para evaluar los efectos de ARNsi sobre la apoptosis. Con el kit "Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay" (Promega Inc.) las células de ensayo se solubilizaron directamente en la placa de cultivo y la actividad caspasa, reflejada como una lectura de fluorescencia, se midió de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Con el segundo kit "Guava Nexin V-PE Kit" (Guava Technologies Inc.), las células tratadas se recogieron mediante tratamiento con tripsina y se lavaron y aproximadamente 10⁵ células se resuspendieron en 40 ul de tampón proporcionado y se añadieron 5 µl de Anexina V (+) y 7-AAD (-). Después de 20 minutos de incubación en hielo, las células se analizaron usando Guava PCA Flowcytometer de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados que demuestran que el silenciamiento de Ovr110 induce apoptosis se muestran en la Figura 12 y Figura 13.

Para los ensayos de anoikis las células IEC-18 y RK3E que expresan los genes indicados se trataron con tripsina y se resuspendieron en medio sin FBS a una densidad de 150.000 y 200.000 células/ml, respectivamente. Una alícuota de 1 ml de la mezcla se sembró en cada pocillo de una placa de 12 pocillos y las muestras se incubaron a 37°C durante 24 h. Después las células se recogieron y evaluaron usando el kit Guave-Nexin V-PE como anteriormente. Ras, un oncogén potente, sirvió como un control positivo y AP como un control negativo para el ensayo de anoikis. Los resultados se muestran en la Figura 15.

SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia de Western

72 h después de la transfección con ARNsi, los extractos celulares se prepararon en hielo usando tampón de solubilización (NP40 al 1%, Na₂PO₄ 10 mM, NaCl 0,15 M) más un cóctel inhibidor de proteasa (Roche Inc.). Los extractos para otros experimentos con células infectadas con virus o no transfectadas se prepararon de una manera similar. Los extractos de proteína de tumores recogidos se prepararon mediante homogeneización de tejido de tumor en trozos y congelados instantáneamente en tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,2, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, IG-Pal al 0,5% más inhibidores de proteasa) seguido por sonicación y después centrifugación en una microcentrífuga para aclarar los extractos. Entre 20 y 50 µg de extracto de proteína se usaron para cada carril de gel; se evaluaron concentraciones equivalentes de proteína para comparaciones de nivel de proteína en el mismo gel. Los extractos aclarados se mezclaron con un volumen igual de tampón de muestra Laemmli concentrado 2x (Invitrogen), calentado a 70°C durante 10 minutos y después se analizaron usando minigeles de SD-poliacrilamida del 4-12% vertidos previamente (Nupage, Invitrogen) con tampón de desarrollo MES (Nupage; Invitrogen). Los geles se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (tamaño de poro 0,45 µm, Invitrogen) usando tampón de transferencia Nupage 1X más metanol al 10%. Las membranas se enjuagaron y bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente usando leche en polvo desnatada al 5% en PBS con Tween-20 al 0,05%. Las membranas se incubaron con anticuerpo primario durante una noche en leche en polvo desnatada al 5% en PBS con Tween-20 al 0,05%. Un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido frente a Ovr110 se produjo usando proteína Ovr110 recombinante. El anticuerpo monoclonal frente a Ovr110 se usó a una concentración final de 1 µg/ml y un anticuerpo monoclonal de ratón frente a GAPDH (Chemicon Inc.) a una concentración final de 2 µg/ml. A continuación de la incubación de anticuerpo primario, las membranas se lavaron cuatro veces a temperatura ambiente durante 10 min, cada una en PBS 1X con Tween-20 al 0,05%. Se usó anti-inmunoglobulina de ratón de cabra enlazada a peroxidasa de rábano picante (Jackson Lab Inc.) (dilución 1:10.000) en leche en polvo desnatada al 5% en PBS más Tween-20 al 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente para detectar el anticuerpo monoclonal primario. Las membranas se lavaron finalmente cuatro veces durante 10 min en PBS 1X más Tween-20 al 0,05% seguido por detección usando reactivo de quimioluminiscencia potenciado (ECL) de acuerdo con las direcciones del fabricante (Amersham).

Construcción de vector de expresión

Para la expresión de proteína Ovr110 en células de mamífero, ADNc de Ovr110 se subclonó en el vector pLXSN (BD Bioscience/Clontech) y se verificó la secuencia. El vector de retrovirus pLXSN utiliza el LTR de MLV para dirigir la expresión de ADNc clonados en el sitio de clonación múltiple y un promotor SV40 que dirige la expresión de un gen Neo que codifica la resistencia a G418. pLAPSN, un vector de expresión retroviral que codifica fosfatasa alcalina (AP), se adquirió en BD Bioscience/Clontech (pLXSN-AP).

Producción de virus

Se usó virus ecotrópico para infectar células RK3E e IEC-18 y virus anfitriónico para infectar células SKOV3. Para el empaquetamiento del virus ecotrópico, un día antes de la transfección, las células 293T se sembraron a una densidad de 8×10^5 células por pocillo de una placa de 6 pocillos en placas revestidas con colágeno Biocoat (BD). Las células se transfectaron con ADN de plásmido purificado usando lipofectamina con la adición de reactivo PLUS (Invitrogen). Por cada pocillo de células se añadieron 0,8 µg de ADN de plásmido de virus: pLXSN-Ovr110, pLXSN-Ovr110HA o pLXSN-AP más 0,8 µg de pVpack-ECO y 0,8 µg de pVpackGP (Stratagene) a una reserva de 125 µl de DMEM sin suero y 10 µl de reactivo PLUS seguido por incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 8 µl de lipofectamina diluidos en 125 µl de medio DMEM se añadieron a la mezcla de reactivo ADN/PLUS y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Un ml de DMEM se añadió a la mezcla de lipofectamina/ADN final y se aplicó a la monocapa de células, que contenía 1 ml de DMEM sin suero, seguido por incubación a 37 °C durante 3 horas. La mezcla de transfección se reemplazó con DMEM que contenía FBS al 20% y las células se cultivaron durante una noche. Finalmente, el medio se cambió a DMEM complementado con FBS al 10% + 100 U/ml de Pen/Strep para recolección del virus. El medio que contenía virus se recogió 24 horas más tarde y se filtró a través de un filtro polisulfónico de 0,45 µm. Para el empaquetamiento de virus anfitriónicos se siguió el mismo procedimiento con la excepción de que se usó el plásmido pVpack Ampho (Stratagene) en lugar del plásmido pVpack Eco.

Infección y selección de virus

Se añadió Polybrene (Bromuro de Hexadimetrina; Sigma) a medio que contenía virus fresco a una concentración final de 4 µg/ml. Células RK3E, IEC-18 o SKOV3, sembradas el día antes a una densidad de 3×10^5 células por placa de 100 mm², se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato que incluía Ca²⁺ y Mg²⁺ (cellgro).

La solución de virus (6 ml por placa de 100 mm²) se aplicó directamente a las células y después se incubó durante 3 horas en una incubadora a 37 °C humidificada con CO₂ al 5% con formación de remolinos ocasional. El medio que contiene virus se reemplazó por medio de cultivo fresco y las células se incubaron a 37 °C durante 60-72 horas punto en el que se incluyó una concentración final de 350 µg/ml de sulfato G418 (Cellgro) en el medio de cultivo para seleccionar células infectadas por virus. Las células se mantuvieron entre el 70-80% de confluencia y el medio que contenía G418 se cambió cada 2 días. A continuación de la selección de G418, se usaron combinaciones de células para experimentos posteriores incluyendo la verificación de expresión de proteína Ovr110 mediante análisis de inmunotransferencia de Western donde las células se extrajeron y analizaron como se ha descrito anteriormente. La expresión de AP por monocapas de células infectadas se supervisó mediante tinción mediante lo cual las monocapas de células se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de glutaraldehído al 0,5%, se enjuagó con PBS, se calentó a 65 °C durante 30 minutos y se visualizó AP mediante incubación con sustrato líquido BCIP/NBT (Sigma) durante 2-3 horas.

Experimentos de xenoinjerto de tumor

Combinaciones de células SKOV3 seleccionadas con G418 e infectadas por retrovirus que expresan AP u Ovr110 se inyectaron por vía subcutánea en ratones desnudos. Las células SKOV3 parentales también se usaron para comparación. 10⁷ de cada tipo de células se implantaron con matrigel en cada uno de 6 ratones. El 100% de los ratones inyectados con células tumorales desarrollaron tumores y la formación de tumor se supervisó mediante palpación y medición de calibrador cuando era posible cada 4 días durante la duración del estudio. Los resultados se muestran en la Figura 14. Los datos se expresan como volumen de tumor de grupo medio a lo largo del tiempo.

20 Ejemplo 6: Detección mediante ELISA de sándwich monoclonal de Ovr110

Placas de poliestireno de unión elevada (Coming Life Sciences (MA)) se revistieron durante una noche a 4 °C con 0,8 µg/pocillo de MAb anti-Ovr110. La solución de revestimiento se aspiró y los sitios de unión libres se bloquearon con 300 µl/pocillo de Superblock-TBS (Pierce Biotechnology, Illinois) más suero fetal al 100% durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después de lavar 4x con TBS+Tween 20 al 0,1%, se añadieron 50 µl de tampón de ensayo (TBS, BSA al 1%, Suero de ratón al 1%, Suero Fetal al 1%, Tween 20 al 0,1%) a cada pocillo y después se añadieron 50 µl de antígeno durante 90 minutos de incubación. Para el experimento del tablero de ajedrez, cada par se ensayó en 50 ng/ml y 0 ng/ml de Ovr110 de mamífero recombinante (parte extracelular). Para cada ELISA de sándwich, se desarrollaron patrones de 10, 2,5, 0,5, 0,25, 0,1 y 0 ng/ml de Ovr110 en paralelo con las muestras de ensayo. Las muestras patrón y de ensayo se diluyeron en tampón de ensayo. Para la detección, se añadieron 100 µl de MAb biotinilado (1 µg/ml) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, mientras se agitaba. Después del lavado se añadieron 100 µl de peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (1 mg/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA) a una dilución de 1:20.000 a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a TA con agitación. Después del lavado, la placa se desarrolló posteriormente usando sustrato DAKO TMB Plus (DAKO, Dinamarca) durante 30 minutos a TA. La reacción se detuvo usando 100 µl/pocillo de HCl 1 N y las placas se leyeron a 450 nm usando un lector de placa Spectramax 190 (Molecular Devices, CA).

Para el ELISA de tablero de ajedrez, se ensayaron todas las combinaciones posibles de anticuerpos para determinar la eficacia como reactivos de revestimiento o de detección. Los pares A72.1/A7.1, A77.1/A57.1, A57.1/A7.1 y A57.1/C3.2 dieron la mejor proporción señal/ruido y se evaluaron adicionalmente en ensayos de ELISA de sándwich para analizar la eficacia de detección de Ovr110 endógeno en lisados a partir de líneas celulares de cáncer y fluidos corporales. El par A72.1/A7.1 se usó para ensayar las 2700 muestras de suero enumeradas más adelante.

Resultados

Los resultados del ELISA de tablero de ajedrez en 10 MAb de la serie A y 8 MAb de la serie C se muestran en las Tablas 9A y 9B. Cada anticuerpo se ensayó como anticuerpo tanto de revestimiento como de detección en todas las combinaciones posibles. Todos los pares se ensayaron por duplicado con 100 ng de proteína Ovr110B recombinante en tampón, con tampón en solitario como un blanco. Los resultados se muestran como proporción señal/ruido específica. Los MAb detectan dos epítomos diferentes, en base a estos datos de emparejamiento. Los MAb Ova110 A7, A77, A87 y A10 reaccionan con un epítomo o epítomos que están lo suficientemente cerca para impedir de manera estérica la unión de los otros tres MAb. Todos los anticuerpos de serie C detectan este epítomo (o epítomos solapantes) también. El otro epítomo o epítomos diferentes se detectan por los MAb Ovr110 A89, A57, A31, A72, A107. Varios pares con la proporción señal/ruido más elevada se usaron para ensayar la sensibilidad por proteína recombinante, reactividad hacia proteína nativa en líneas celulares y algunas muestras de suero inicial.

Especificidades de epítipo – Unión de MAb y cartografía de epítipo

Tabla 9A: Emparejamiento de MAb de serie A de Ovr110 mediante ELISA de sándwich

MAb de detección	de	A7	A10	A13	A22	A31	A57	A77	A87	A89	A107
MAb de revestimiento	de										
A7		1,8	2,9	1,1	9,7	7,24	10	2,4	1,7	7,9	9,7
A10		3,5	3,2	3,5	19,9	14,4	19,9	4,5	3,5	16,6	18,5
A13		1,5	4,8	1,1	7,9	5,9	8,1	2,1	1,4	6,2	8,1
A22		21	25	6,5	5,8	3,6	7,13	12,6	15,5	4,7	5,8
A31		11,6	18,77	4,8	7,9	4,7	8,5	6,8	11,1	6,1	7,7
A57		7,1	26	7	8,5	5,7	9,7	13,3	14,5	7,1	8,7
A77		7,7	12	2,9	17,3	16	19,6	2	7,3	16,6	18,8
A87		1,7	2,7	1,1	7,1	5,6	8	2	1,6	6,2	7,8
A89		18	22,5	6,9	8,2	5,7	8,9	12,2	14,2	6,9	8,7
A107		21,5	25,5	6,7	7,3	4,7	7,9	12,7	15,4	5,7	7,3

Tabla 9B: Emparejamiento de MAb de serie C de Ovr110 mediante ELISA de sándwich

MAb de Det	C 3.2	C 5.1	C 5.3	C7	C9	C11	C12	C17	A72	A7.1	A57.1	A77.1
MAb de Rev												
C3	1	1	1	7	2	3	4	1	8	1	8	2
C5.1	1	1	1	5	1	2	3	1	6	1	6	1
C5.3	1	1	1	6	2	2	3	1	7	1	7	2
C7	12	8	9	1	4	11	14	3	34	14	45	2
C9	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	3	1
C11	4	3	3	14	2	1	7	1	2	5	2	2
C12	2	2	2	4	1	2	1	1	7	3	8	1
C17	1	1	1	3	1	1	2	1	4	1	4	1
A72	11	8	9	3/3	5	1	24	3	1	18	1	3
A57	12	8	10	3/3	6	1	24	3	1	18	1	8
A77	6	4	4	2	2	5	5	2	19	8	21	1
MAb de control	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

5

El mapa de epítipo de los MAb de Ovr110 obtenido a partir de los resultados en estas tablas se muestra en la Figura 16.

Muestras de suero humano

Las muestras de suero de cáncer humano y benigno se obtuvieron en IMPATH-BCP, Inc y DSS (Diagnostic Support Service). Las muestras de suero de mujeres sanas se obtuvieron en ProMedex, LCC. Todas las muestras se distribuyeron en alícuotas tras su llegada y se almacenaron a – 80 °C hasta su uso.

5 Resultados

Como se ha descrito anteriormente, para la detección de Ovr110 en muestras de suero, se usó un sistema de detección sensible en base al uso de peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato TMB de sensibilidad elevada (DAKO). La dosis mínima detectable (DMD) para Over110 en este formato de ELISA es 100 pg/ml. Para el cálculo de valores medios, las muestras con valores por debajo de la DMD se definieron como 100 pg/ml de Over110. La dosis mínima detectable se define como dos abreviaturas convencionales por encima de la señal de fondo. La mayoría de las muestras de suero de pacientes sanos mostraron concentraciones de Ovr110 bajas en el ELISA de sándwich mientras que los sueros de pacientes con cáncer ovárico tienen niveles elevados de Ovr110.

Se ensayó la concentración de Ovr110 en más de 2700 muestras de suero a partir de pacientes con cáncer de pulmón, mamario, de colon, de próstata u ovárico o con enfermedades no cancerosas benignas. Para una lista completa de todas las muestras ensayadas, véase la Tabla 10 más adelante.

Tabla 10: Muestras de Suero Ensayadas Mediante ELISA de Sándwich

Tipo de Muestra	Nº de Muestras
Normal	555 (281-H, 274-M)
Cáncer Mamario	260
Benigno Mamario	180
Cáncer de Colon	150 (71-H, 79-M)
Benigno de Colon	296 (151-H, 145-M)
Cáncer Pulmonar	323 (235-H, 93-M)
Benigno de Pulmón	250 (130-H, 120-M)
Cáncer Ovárico	236
Benigno de Ovario	150
Cáncer Prostático	138
Benigno de Próstata	147

La Figura 17 muestra la concentración de Ovr110 en suero a partir de 540 donantes sanos y más de 1200 pacientes con cáncer. Los niveles elevados de Ovr110 se observan en algunos pacientes de todos los tipos de cáncer pero los pacientes con cáncer ovárico tienen la concentración de Ovr110 media más elevada.

Se ensayó la concentración de Ovr110 en sueros de ciento cuarenta y siete mujeres con cáncer ovárico seroso o endometrial y sesenta y siete sueros de mujeres con cáncer mucinoso, usando sueros que representan las cuatro fases de la progresión del tumor. Como se muestra en la Figura 18, los primeros dos tipos de cáncer ovárico son positivos para Ovr110 mediante IHC mientras que el cáncer mucinoso no lo es. En concordancia con estos datos, la concentración de Ovr110 media en suero de pacientes con cáncer endometrial y seroso es más elevada que en pacientes con cáncer mucinoso.

Cuando se compara con mujeres sanas, la concentración media de Ovr110 en cáncer seroso y endometrial es más de 2 veces más elevada. La mayoría de las mujeres en este grupo de 260 mujeres sanas tienen más de 50 años de edad para reflejar la distribución de edad de mujeres con cáncer ovárico. No se pueden observar diferencias en la detección de Ovr110 en mujeres sanas de edad premenopáusica y postmenopáusica. Más importante, tampoco se detecta un nivel elevado de Ovr110 en suero de ciento cincuenta mujeres con enfermedades ováricas benignas (50 sueros de pacientes con endometriosis, ovarios aumentados y ovarios poliquísticos, respectivamente).

En concordancia con los hallazgos de que Ovr110 se expresa como una proteína de membrana de la superficie celular, la concentración global de Ovr110 en suero es muy baja incluso en mujeres con cáncer seroso. Por lo tanto, la concentración de Ovr110 detectada en sueros de mujeres con cáncer seroso es inferior a 20 ng/ml.

Ejemplo 7: Depósitos

Depósito de líneas celulares y ADN

5 Las siguientes líneas de células de hibridoma se depositaron en la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC), localizada en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU. y se asignaron números de acceso.

10 Ovr110.A57.1 (PTA-5180) se depositó el 8 de mayo de 2003. Ovr110.A7.1 (PTA-5855) y Ovr110.A72.1 (PTA-5856) se depositaron el 11 de marzo de 2004. Ovr110.C3.2 (PTA-5884) se depositó el 23 de marzo de 2004. Los nombres de las líneas de células de hibridoma depositadas anteriormente se pueden acortar para facilitar la consulta. Por ejemplo, A57.1 corresponde a Ovr110.A57.1. Estos hibridomas corresponden a los clones (con sus nombres completos) enumerados en la Tabla 11.

Tabla 11: Depósitos en ATCC

Hibridoma	Nº de Acceso de ATCC	Fecha de Depósito
Ovr110.A57.1	PTA-5180	8 de mayo de 2003
Ovr110.A7.1	PTA-5855	11 de marzo de 2004
Ovr110.A72.1	PTA-5856	11 de marzo de 2004
Ovr110.C3.2	PTA-5884	23 de marzo de 2004

15 Estos depósitos se realizaron conforme a las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el Fin de Procedimientos de Patente y las Regulaciones en el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años a partir de la fecha de depósito. Los organismos se harán disponibles por ATCC de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest y sujetos a un acuerdo entre diaDexus, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente e ilimitada de la progenie de los cultivos al público tras la expedición de la Patente de los Estados Unidos permanente o tras la apertura al público de cualquier solicitud de Patente de los Estados Unidos o extranjera, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a uno determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas de los Estados Unidos para tener derecho al mismo de acuerdo con 35 USC §122 y las normas del Comisionado dictadas conforme al mismo (incluyendo 37 CFR §1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

25 El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si los cultivos en depósito murieran o se perdieran o se destruyeran durante su cultivo en condiciones adecuadas, los mismos se reemplazarán inmediatamente a la notificación con un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de las cepas depositadas no se debe interpretar como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente. La realización de estos depósitos no es de ninguna manera una admisión de que los depósitos son necesarios para posibilitar la invención.

Listado de secuencias

- <110> diaDexus, Inc.
Pilkington, Glenn
Keller, Gilbert-Andre
- 5 Li, Wenlu
Corral, Laura
Simon, Iris
Papkoff, Jackie
- <120> COMPOSICIONES DE ANTICUERPO OVR110 Y PROCEDIMIENTOS DE USO
- 10 <130> DEX-0483
- <150> US60/556.464
<151> 25-03-2004
- <150> US60/552.959
<151> 12-03-2004
- 15 <150> US60/469.555
<151> 09-05-2003
- <160> 19
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- 20 <211> 306
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Sintético
- 25 <400> 1

```

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15

Ala Thr Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser
                20           25           30

Ile Ile Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly
        35           40           45

Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly
        50           55           60

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

Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly
            85           90           95
    
```


ES 2 369 626 T3

Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp
 100 105 110

Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val
 115 120 125

Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly
 130 135 140

Thr Tyr Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn
 145 150 155 160

Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp
 165 170 175

Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe
 180 185 190

Pro Gln Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn
 195 200 205

Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val
 210 215 220

Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr
 225 230 235 240

Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile
 245 250 255

Lys Val Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu
 260 265 270

Asn Ser Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp
 275 280 285

Ala Leu Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys His His His His
 290 295 300

His His
 305

<210> 2

<211> 278

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 2

ES 2 369 626 T3

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Ala Thr Met Gly Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val
 20 25 30

Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Gln Ser Cys Thr Phe
 35 40 45

Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu
 50 55 60

Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu
 65 70 75 80

Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp
 85 90 95

Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu
 100 105 110

Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys
 115 120 125

Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu
 130 135 140

Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala
 145 150 155 160

Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp
 165 170 175

Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn
 180 185 190

Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr
 195 200 205

Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala
 210 215 220

ES 2 369 626 T3

Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His
225 230 235 240

Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe
245 250 255

Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
260 265 270

His His His His His His
275

<210> 3
<211> 30
<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 3

ccaatgcatg gtatttcagg gagacactcc 30

10 <210> 4
<211> 30
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

15

<400> 4

cggctagctt ttagcatcag gtaagggctg 30

20 <210> 5
<211> 292
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 5

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Ala Thr His Glu Ala Glu Gln Ser Arg Met His Gly Ile Ser Gly Arg
20 25 30

25 His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu
35 40 45

ES 2 369 626 T3

Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp
 50 55 60
 Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu
 65 70 75 80
 Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg
 85 90 95
 Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser
 100 105 110
 Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys
 115 120 125
 Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys
 130 135 140
 Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser
 145 150 155 160
 Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr
 165 170 175
 Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val
 180 185 190
 Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val
 195 200 205
 Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met
 210 215 220
 Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu
 225 230 235 240
 Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala
 245 250 255
 Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro
 260 265 270
 Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys Ala Ser His His His His His His
 275 280 285
 His His His His
 290

5 <210> 6
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 369 626 T3

<220>

<223> Sintético

<400> 6

cttgtttaa acatgaagac attgcctgcc atg 33

5

<210> 7

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintético

<400> 7

cggctagcac tcctcacaca tatggatgc 29

<210> 8

<211> 29

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 8

20 cggctagcgg gtctgctgc cactcgtc 29

<210> 9

<211> 289

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Sintético

<400> 9

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

Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu
20 25 30

Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile
35 40 45

ES 2 369 626 T3

Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala
50 55 60

Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val
65 70 75 80

Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser
85 90 95

Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser
100 105 110

Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser
115 120 125

Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser
130 135 140

Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Ser Leu Leu Pro
145 150 155 160

Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Cys Phe Cys Leu Phe Cys
165 170 175

Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala
180 185 190

Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln Thr
195 200 205

Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly
210 215 220

Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser
225 230 235 240

Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val
245 250 255

Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Leu Asn Ser Arg Leu Ala
260 265 270

Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg
275 280 285

Ser

<210> 10
<211> 241
<212> PRT

ES 2 369 626 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 10

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

Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu
20 25 30

Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile
35 40 45

Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala
50 55 60

Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val
65 70 75 80

Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser
85 90 95

Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser
100 105 110

Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser
115 120 125

Thr Thr Leu Tyr Val Thr Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala
130 135 140

Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln Thr
145 150 155 160

Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly
165 170 175

Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser
180 185 190

5

Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val
195 200 205

Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Leu Asn Ser Arg Leu Ala
210 215 220

Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg
225 230 235 240

Ser

ES 2 369 626 T3

<210> 11
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 11

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

Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu
 20 25 30

Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile
 35 40 45

Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala
 50 55 60

Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val
 65 70 75 80

Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser
 85 90 95

Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser
 100 105 110

Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser
 115 120 125

Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser
 130 135 140

ES 2 369 626 T3

Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Ala Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
 145 150 155 160

Gly Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
 165 170 175

Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 180 185 190

Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val
 195 200 205

Val Val Asp Val Ser Glu Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
 210 215 220

Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
 225 230 235 240

Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
 245 250 255

Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
 260 265 270

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Val Arg
 275 280 285

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
 290 295 300

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
 305 310 315 320

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
 325 330 335

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
 340 345 350

Lys Leu Arg Val Glu Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
 355 360 365

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

Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 385 390

<210> 12
 <211> 614
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5

ES 2 369 626 T3

<223> Sintético

<400> 12

Met Asn Arg Thr Trp Pro Arg Arg Ile Trp Gly Ser Ser Gln Asp Glu
 1 5 10 15

Ala Glu Leu Ile Arg Glu Asp Ile Gln Gly Ala Leu His Asn Tyr Arg
 20 25 30

Ser Gly Arg Gly Glu Arg Arg Ala Ala Ala Leu Arg Ala Thr Gln Glu
 35 40 45

Glu Leu Gln Arg Asp Arg Ser Pro Ala Ala Glu Thr Pro Pro Leu Gln
 50 55 60

Arg Arg Pro Ser Val Arg Ala Val Ile Ser Thr Val Glu Arg Gly Ala
 65 70 75 80

Gly Arg Gly Arg Pro Gln Ala Lys Pro Ile Pro Glu Ala Glu Glu Ala
 85 90 95

Gln Arg Pro Glu Pro Val Gly Thr Ser Ser Asn Ala Asp Ser Ala Ser
 100 105 110

Pro Asp Leu Gly Pro Arg Gly Pro Asp Leu Val Val Leu Gln Ala Glu
 115 120 125

Arg Glu Val Asp Ile Leu Asn His Val Phe Asp Asp Val Glu Ser Phe
 130 135 140

Val Ser Arg Leu Gln Lys Ser Ala Glu Ala Ala Arg Val Leu Glu His
 145 150 155 160

Arg Glu Arg Gly Arg Arg Ser Arg Arg Arg Ala Ala Gly Glu Gly Leu
 165 170 175

Leu Thr Leu Arg Ala Lys Pro Pro Ser Glu Ala Glu Tyr Thr Asp Val
 180 185 190

ES 2 369 626 T3

Leu Gln Lys Ile Lys Tyr Ala Phe Ser Leu Leu Ala Arg Leu Arg Gly
 195 200 205

Asn Ile Ala Asp Pro Ser Ser Pro Glu Leu Leu His Phe Leu Phe Gly
 210 215 220

Pro Leu Gln Met Ile Val Asn Thr Ser Gly Gly Pro Glu Phe Ala Ser
 225 230 235 240

Ser Val Arg Arg Pro His Leu Thr Ser Asp Ala Val Ala Leu Leu Arg
 245 250 255

Asp Asn Val Thr Pro Arg Glu Asn Glu Leu Trp Thr Ser Leu Gly Asp
 260 265 270

Ser Trp Thr Arg Pro Gly Leu Glu Leu Ser Pro Glu Glu Gly Pro Pro
 275 280 285

Tyr Arg Pro Glu Phe Phe Ser Gly Trp Glu Pro Pro Val Thr Asp Pro
 290 295 300

Gln Ser Arg Ala Trp Glu Asp Pro Val Glu Lys Gln Leu Gln His Glu
 305 310 315 320

Arg Arg Arg Arg Gln Gln Ser Ala Pro Gln Val Ala Val Asn Gly His
 325 330 335

Arg Asp Leu Glu Pro Glu Ser Glu Pro Gln Leu Glu Ser Glu Thr Ala
 340 345 350

Gly Lys Trp Val Leu Cys Asn Tyr Asp Phe Gln Ala Arg Asn Ser Ser
 355 360 365

Glu Leu Ser Val Lys Gln Arg Asp Val Leu Glu Val Leu Asp Asp Ser
 370 375 380

Arg Lys Trp Trp Lys Val Arg Asp Pro Ala Gly Gln Glu Gly Tyr Val
 385 390 395 400

Pro Tyr Asn Ile Leu Thr Pro Tyr Pro Gly Pro Arg Leu His His Ser
 405 410 415

Gln Ser Pro Ala Arg Ser Leu Asn Ser Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ala
 420 425 430

ES 2 369 626 T3

Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Leu Ala Arg Pro Arg Trp Asp Arg
 435 440 445

Pro Arg Trp Asp Ser Cys Asp Ser Leu Asn Gly Leu Asp Pro Ser Glu
 450 455 460

Lys Glu Lys Phe Ser Gln Met Leu Ile Val Asn Glu Glu Leu Gln Ala
 465 470 475 480

Arg Leu Ala Gln Gly Arg Ser Gly Pro Ser Arg Ala Val Pro Gly Pro
 485 490 495

Arg Ala Pro Glu Pro Gln Leu Ser Pro Gly Ser Asp Ala Ser Glu Val
 500 505 510

Arg Ala Trp Leu Gln Ala Lys Gly Phe Ser Ser Gly Thr Val Asp Ala
 515 520 525

Leu Gly Val Leu Thr Gly Ala Gln Leu Phe Ser Leu Gln Lys Glu Glu
 530 535 540

Leu Arg Ala Val Ser Pro Glu Glu Gly Ala Arg Val Tyr Ser Gln Val
 545 550 555 560

Thr Val Gln Arg Ser Leu Leu Glu Asp Lys Glu Lys Val Ser Glu Leu
 565 570 575

Glu Ala Val Met Glu Lys Gln Lys Lys Lys Val Glu Gly Glu Val Glu
 580 585 590

Met Glu Val Ile Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Arg Trp Ala
 595 600 605

His His His His His His
 610

<210> 13

<211> 309

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 13

Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

ES 2 369 626 T3

Ala Thr Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser
 20 25 30

Ile Ile Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly
 35 40 45

Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly
 85 90 95

Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp
 100 105 110

Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val
 115 120 125

Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly
 130 135 140

Thr Tyr Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn
 145 150 155 160

Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp
 165 170 175

Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe
 180 185 190

Pro Gln Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn
 195 200 205

Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val
 210 215 220

Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr
 225 230 235 240

Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile
 245 250 255

ES 2 369 626 T3

Lys Val Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu
 260 265 270

Asn Ser Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp
 275 280 285

Ala Leu Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys Tyr Pro Tyr Asp
 290 295 300

Val Pro Asp Tyr Ala
 305

- <210> 14
- <211> 19
- <212> ARN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintético
- <400> 14
- gguguuuag gcuuggucc 19
- 10 <210> 15
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Sintético
- <400> 15
- cucacagaug cuggcaccu 19
- <210> 16
- <211> 19
- 20 <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintético
- <400> 16
- 25 gguugugucu gugcucuac 19
- <210> 17
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Sintético
- <400> 17
- ccgugcuccu ggggcuggg 19
- <210> 18
- 35 <211> 19
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 369 626 T3

<220>

<223> Sintético

<400> 18

uucuccgaac gugucacgu 19

5

<210> 19

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintético

<400> 19

ggaguuggau cucucagaa 19

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que se produce mediante un hibridoma seleccionado entre los números de acceso de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856 y PTA-5884 o un anticuerpo que compite por la unión al mismo epítipo que el epítipo unido por el anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre los números de acceso de la Colección Americana de Cultivos Tipo PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856 y PTA-5884, en el que dicho anticuerpo se internaliza tras la unión a Ovr110 en una célula de mamífero *in vivo*.
2. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquier reivindicación precedente capaz de inhibir el crecimiento de células de cáncer que expresan Ovr110 *in vivo*.
- 10 3. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que es un anticuerpo quimérico o humanizado o humano.
4. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que se conjuga a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico.
5. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el agente citotóxico se selecciona entre toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.
- 15 6. Una célula que produce un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Una composición que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo.
8. Un procedimiento *in vitro* de destrucción de una célula de cáncer que expresa Ovr110, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula de cáncer con un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, destruyendo de esa manera la célula de cáncer.
- 20 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la célula de cáncer se selecciona entre células de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón y mamario.
10. Un procedimiento *in vitro* para determinar si las células en una muestra expresan Ovr110, comprendiendo el procedimiento:- 25 (a) poner en contacto una muestra de células con el anticuerpo monoclonal Ovr110 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en condiciones adecuadas para la unión específica del anticuerpo Ovr110 a Ovr110; y
(b) determinar el nivel de unión del anticuerpo a células en la muestra o el nivel de internalización de dicho anticuerpo Ovr110 por las células en dicha muestra,
- 30 en el que la unión del anticuerpo Ovr110 a células en la muestra o internalización del anticuerpo Ovr110 por las células en la muestra indica que las células en la muestra expresan Ovr110.
- 11. Uso de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de un medicamento para tratar cáncer.
- 35 12. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el medicamento es para tratar cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario.
- 14. Un anticuerpo de la reivindicación 12, en el que el cáncer es cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o mamario.
- 40 15. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el diagnóstico de cánceres que expresan Ovr110.
- 16. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en la determinación de fase de cánceres que expresan Ovr110.

FIGURA 1: Resultados de Análisis FACS de células LMTK de Ratón Transfectadas con Ovr110

Fig. 1A. Anti-Ig de ratón de burro-PE

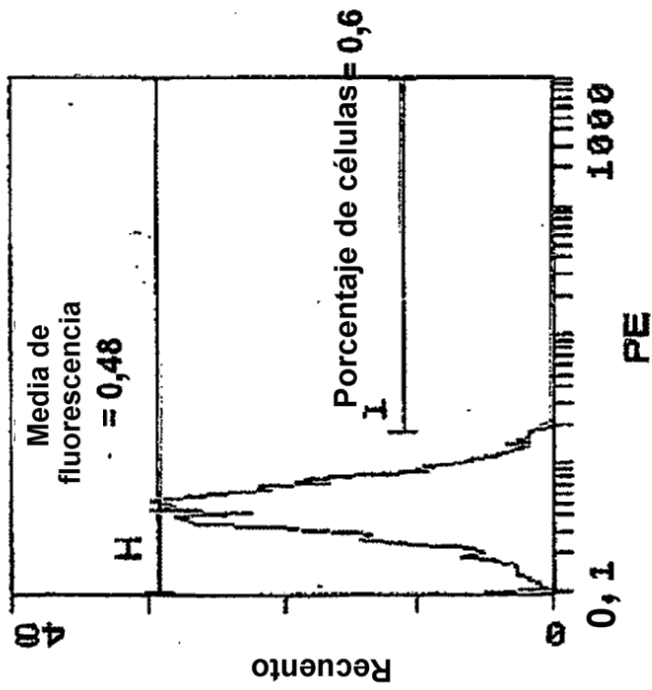
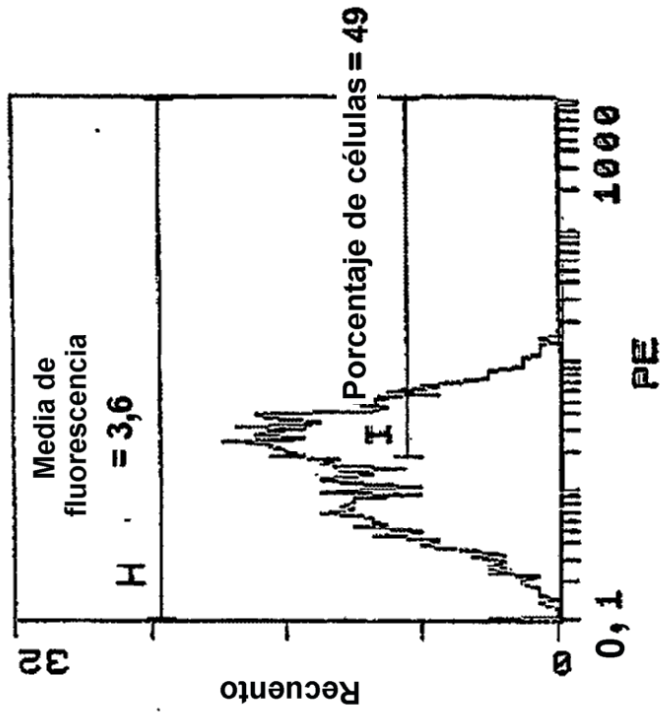


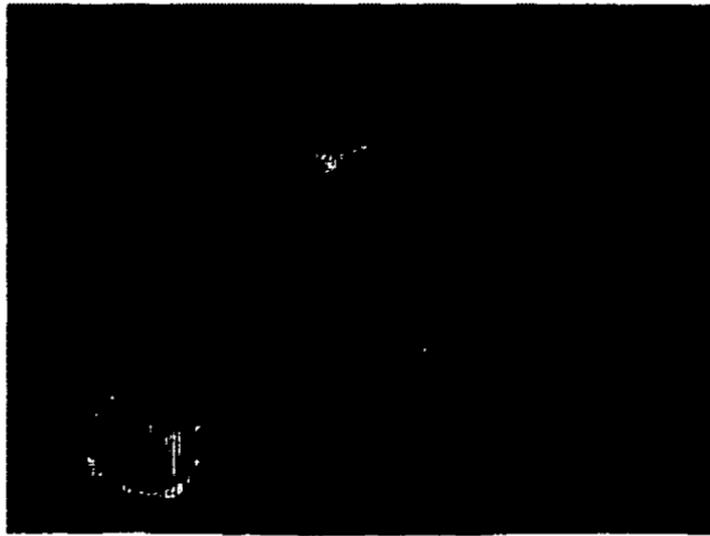
Fig. 1B MAb A7.1 y Anti-Ig de ratón de burro-PE



Intensidad de fluorescencia

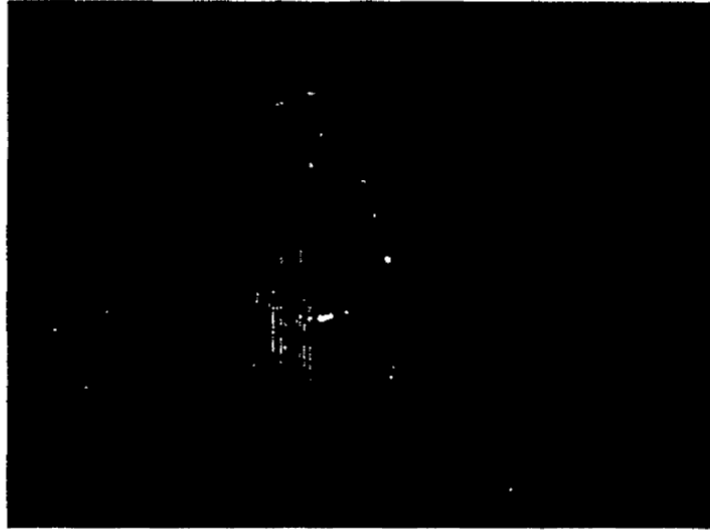
FIGURA 2:
Inmunofluorescencia con Ovr110-A57.1 en células de cáncer ovárico y mamario vivas

Fig 2A.



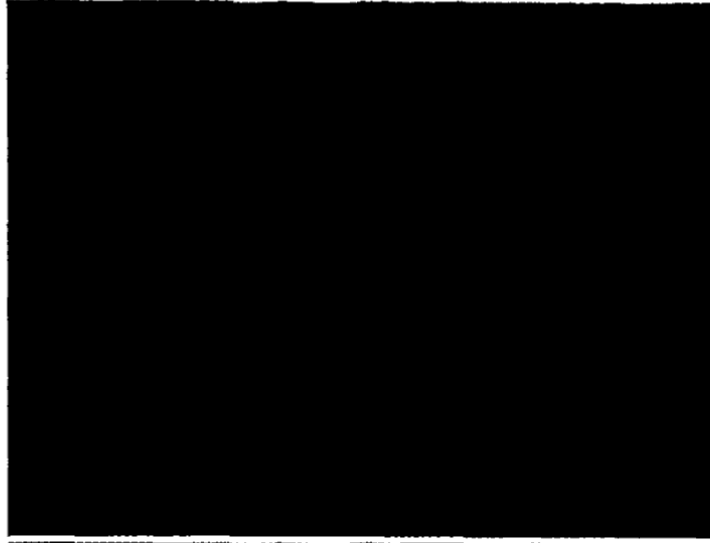
OVCAR-3

Fig 2B.



SKBr-3

Fig 2C.



CaOV-3

FIGURA 3:
Unión e internalización de Ovr110-A57.1 en células de cáncer ovárico y mamario vivas

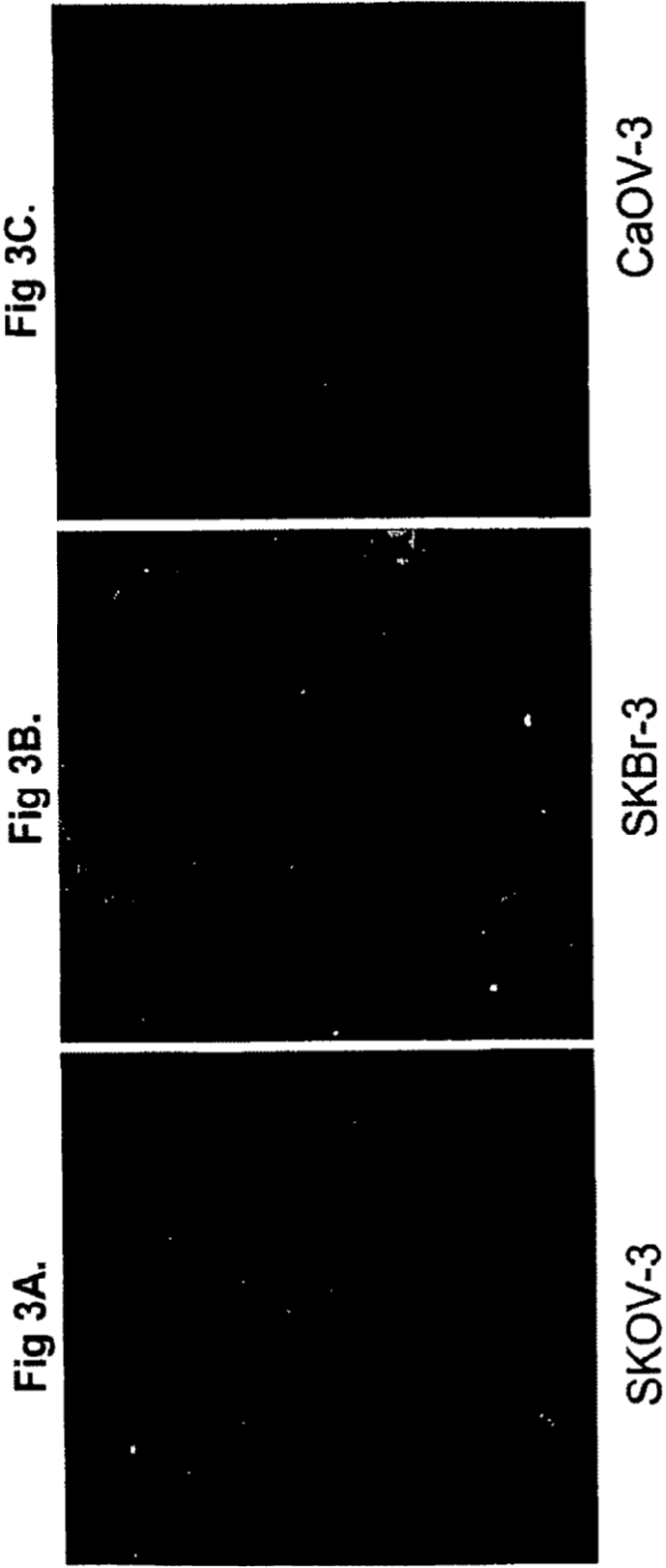


FIGURA 4:
Inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma seroso ovárico

Fig 4A.



Fig 4B.



Fig 4C.

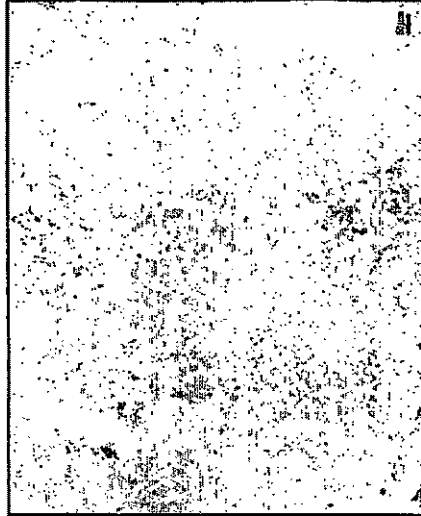


FIGURA 5
Inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma ductal infiltrante

Fig 5A.



Fig 5B.



Fig 5C.

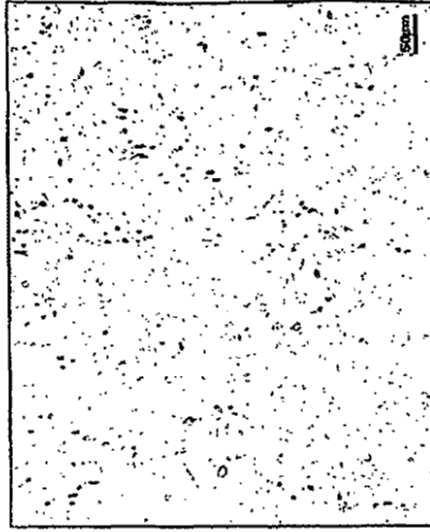


FIGURA 6
Inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma de páncreas

Fig 6A.

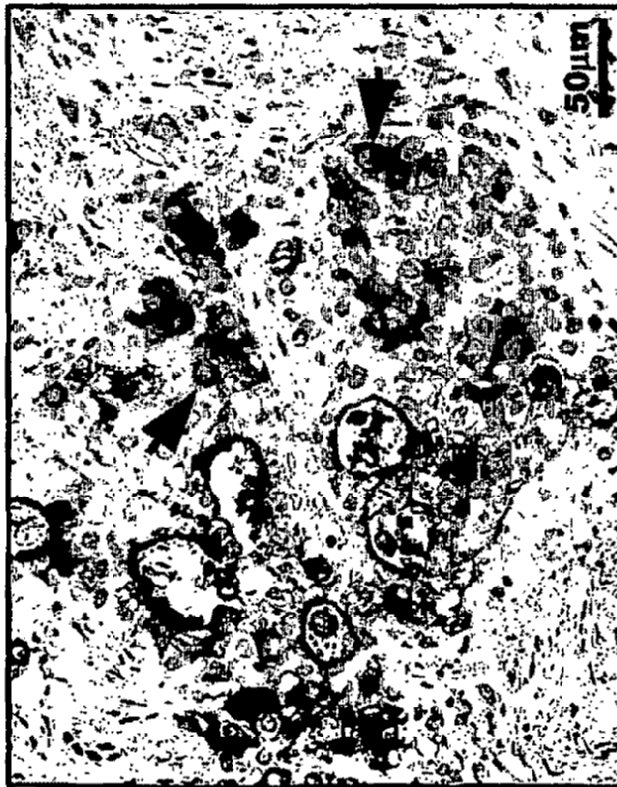


Fig 6B.

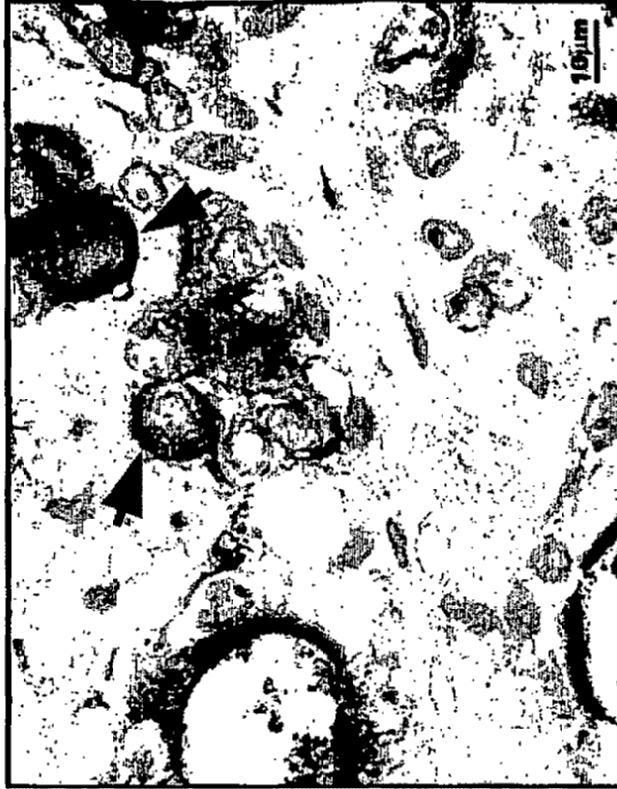


Figura 7A-7F: Expresión de miembros de la familia B7 el día 3 en CÉLULAS T CD3 SEPARADAS POR FITC estimuladas con PHA

Fig 7A.
CD80 (B7.1)

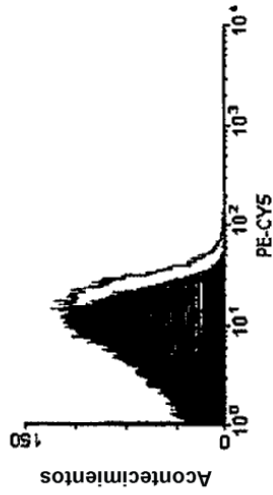


Fig 7B.
CD86 (B7.2)

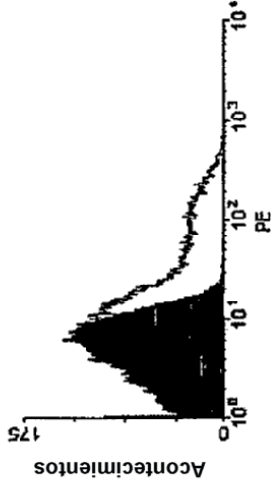


Fig 7C.
Ovr110 (A57.1)

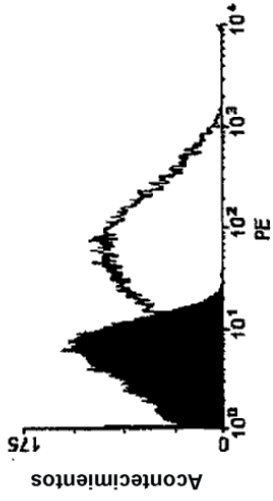


Fig 7D.
CD71 (Transferrina)

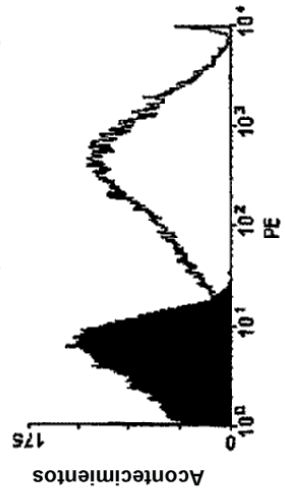


Fig 7E.
CD25 (IL-2R)

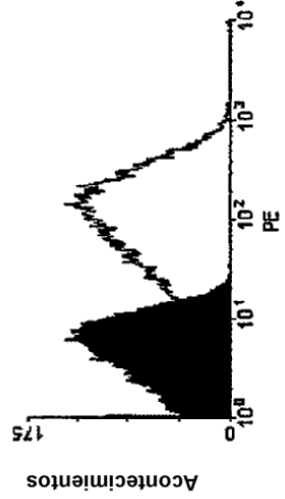


Fig 7F.
2° Ab en solitario

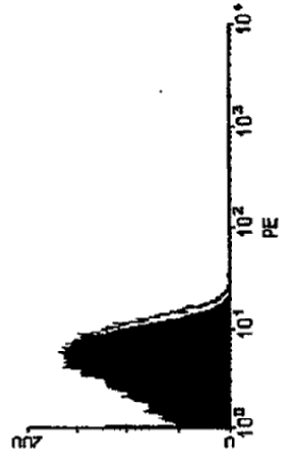
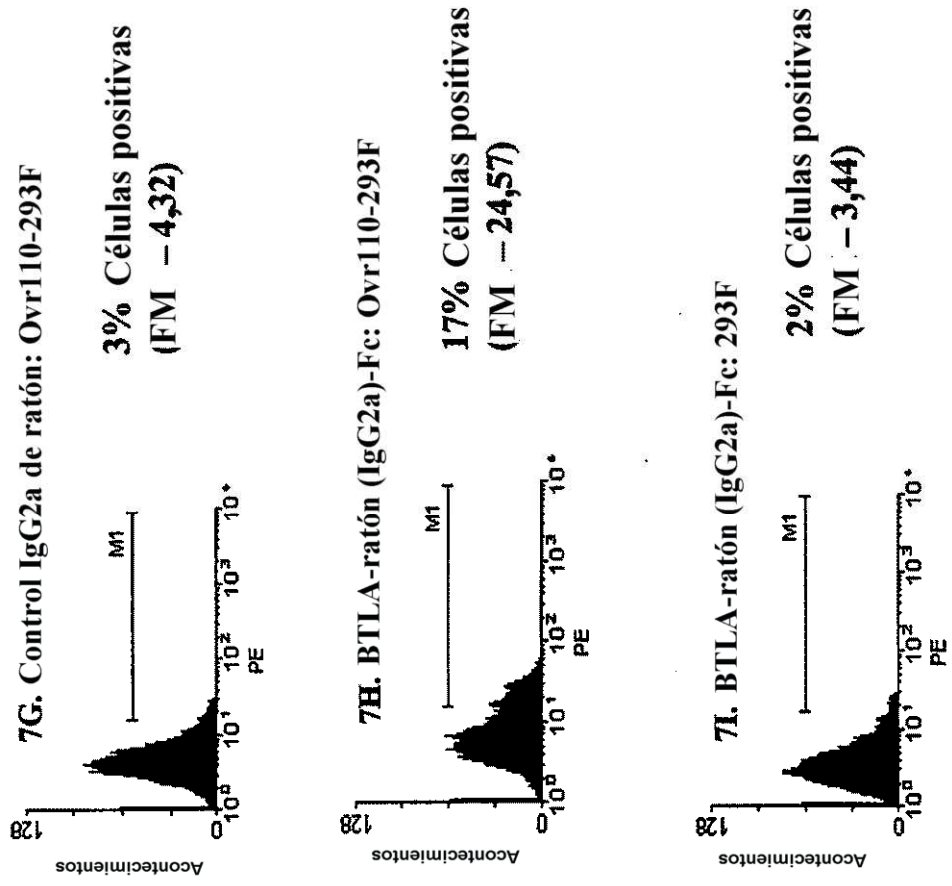


Figura 7G, 7H, 7I: Unión de proteína de fusión BTLA-Fc a Células Ovr110-293F



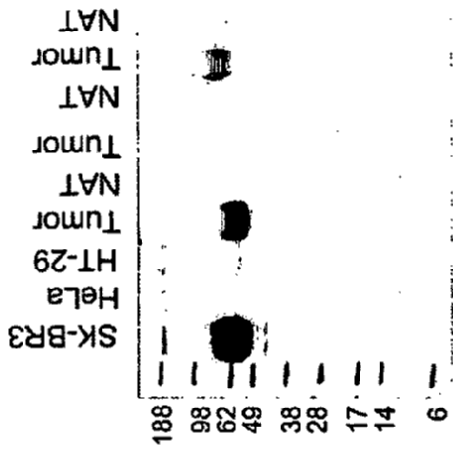


Fig 8B.

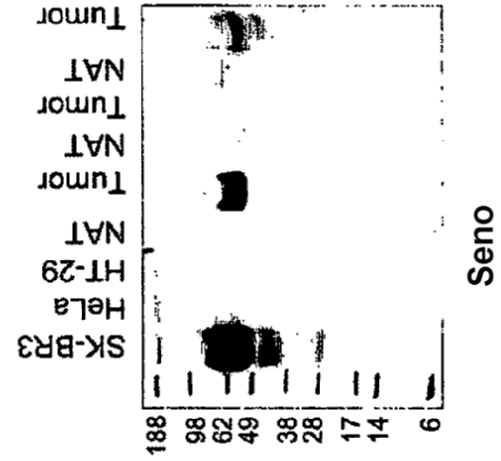


Fig 8C.

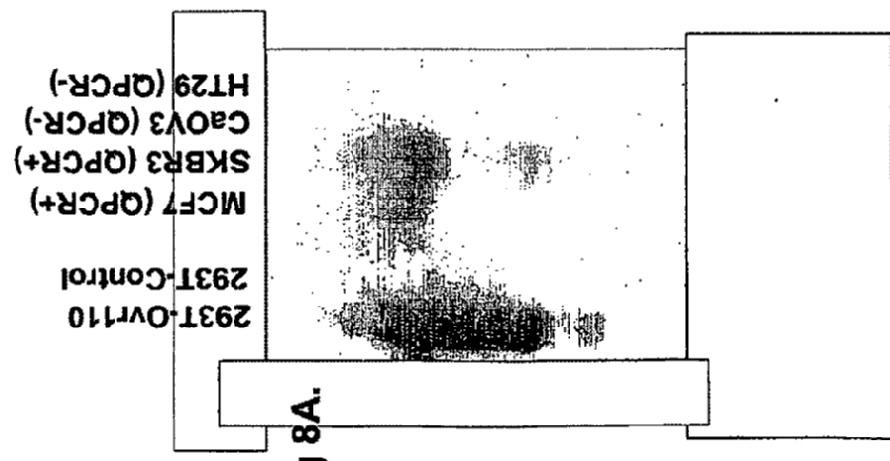


FIGURA 8:
Detección por transferencia de Western de proteína Ovr110 con mAb A57.1 en líneas celulares y tejidos de tumor humanos

FIGURA 9:
La proteína Ovr110 no se detecta
en extractos de órganos principales

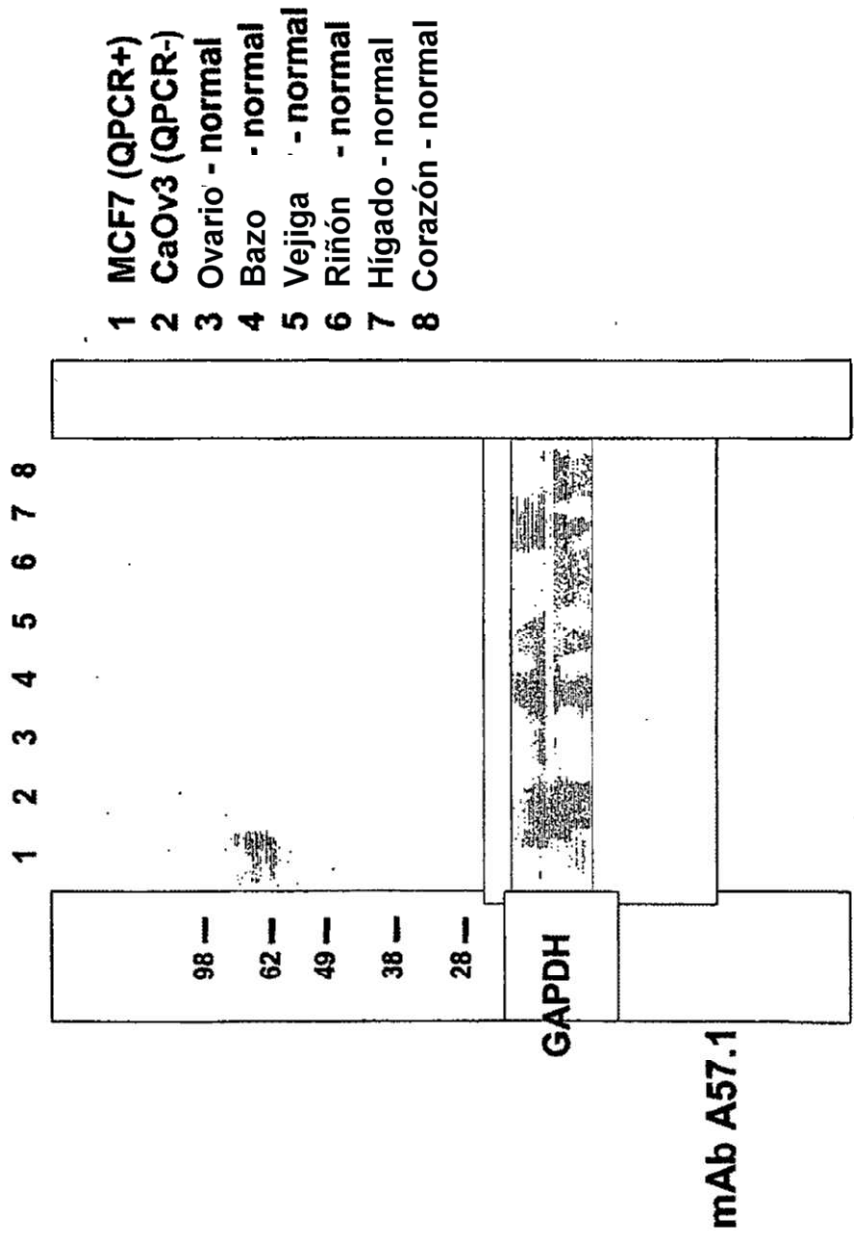
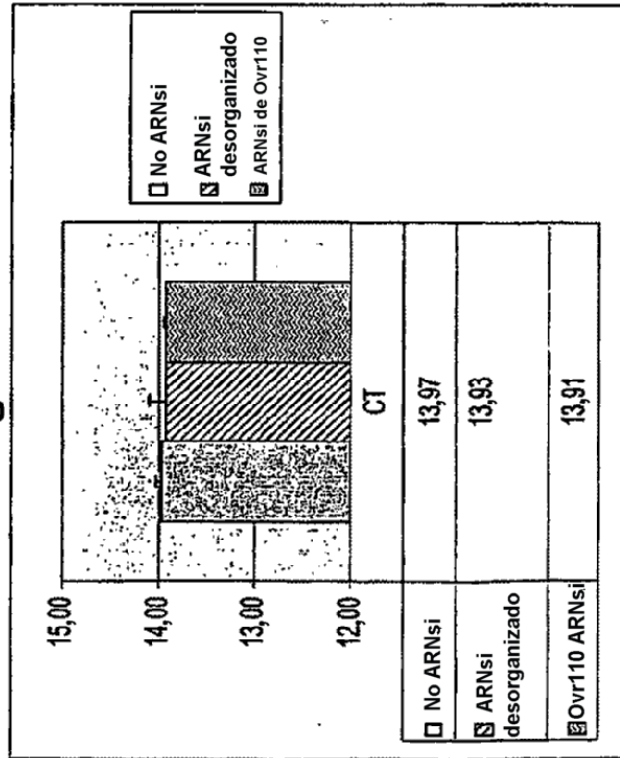


FIGURA 10: Silenciamiento específico de ARNm de Ovr110 en células de cáncer mamario SKBR3

Fig 10A.

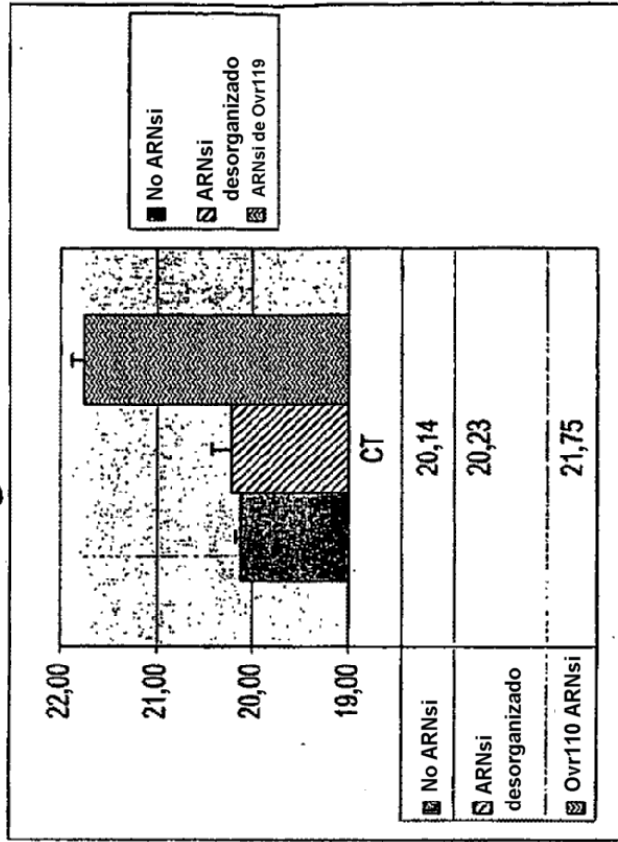


Cebadores GAPDH Q-PCR

$\Delta CT = 0$

silenciamiento de GAPDH 0 %

Fig 10B.



Cebadores Ovr110 Q-PCR

$\Delta CT = 1,5$

silenciamiento de Ovr110 65 %

**FIGURA 11: Regulación negativa de proteína Ovr110 |
por ARNsi en células SKBR3**

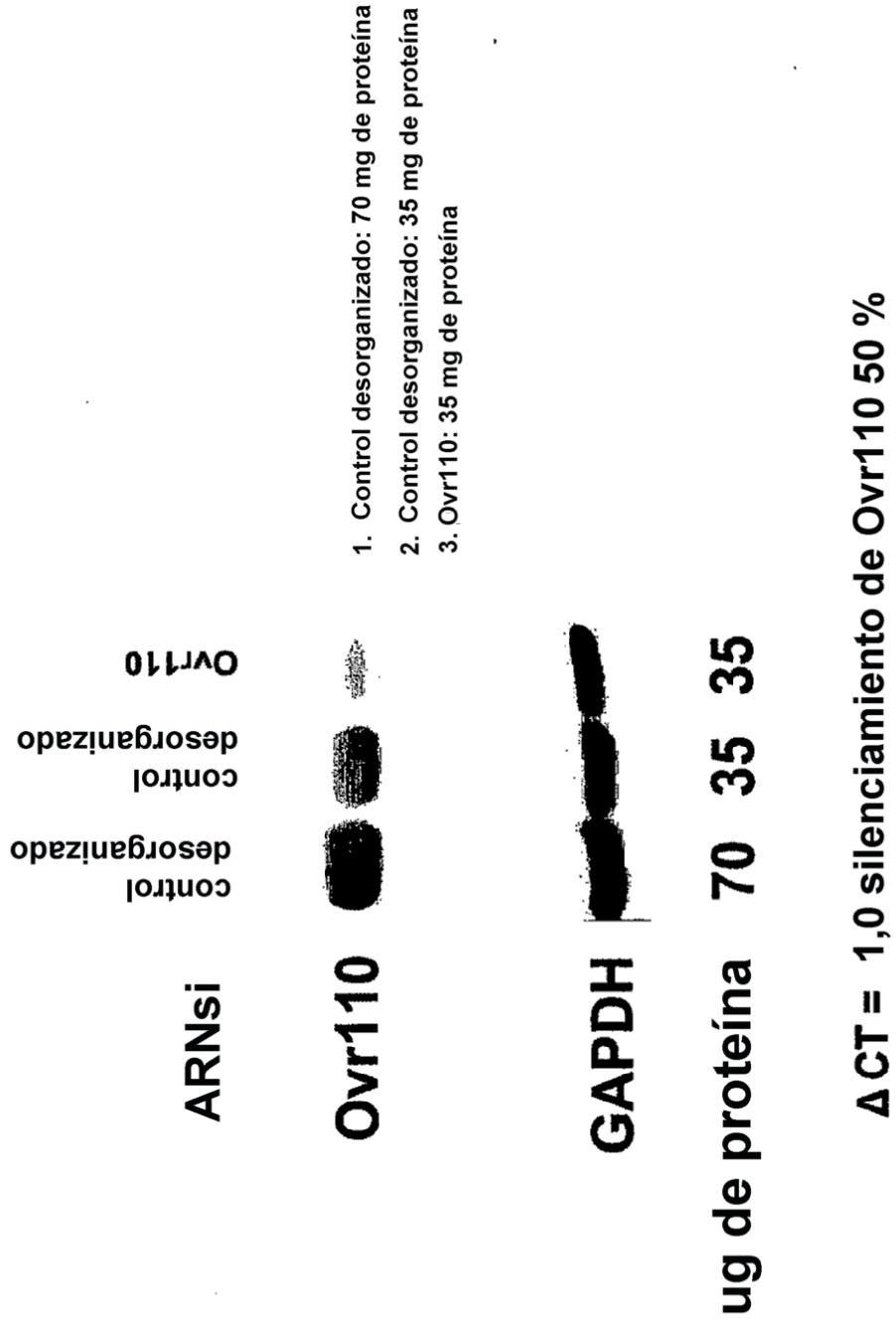
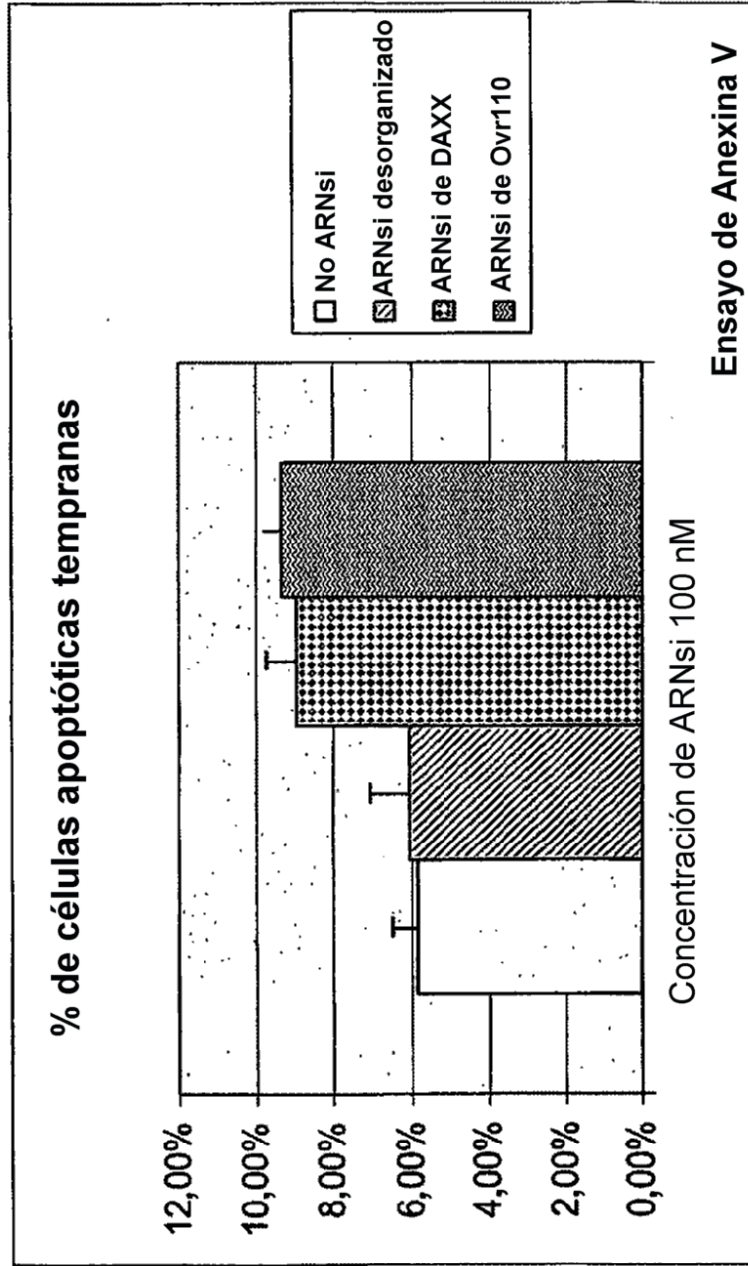


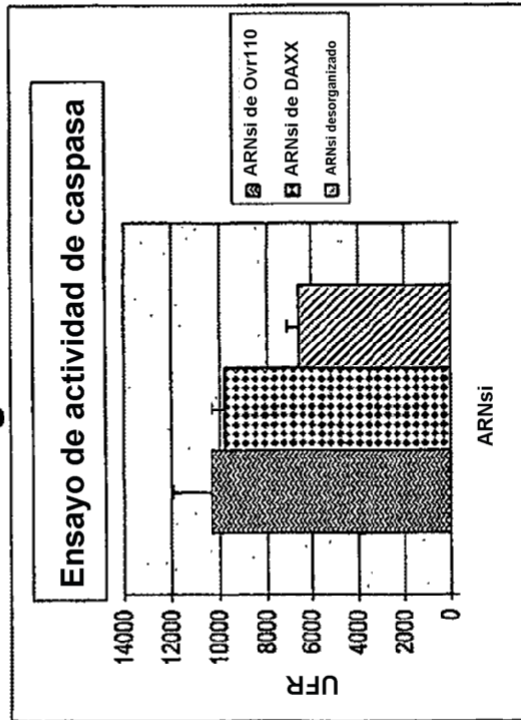
FIGURA 12: Silenciamiento de ARNm de Ovr110 induce apoptosis en células SKBR3



DAXX: control positivo
 Desorganizado: control negativo

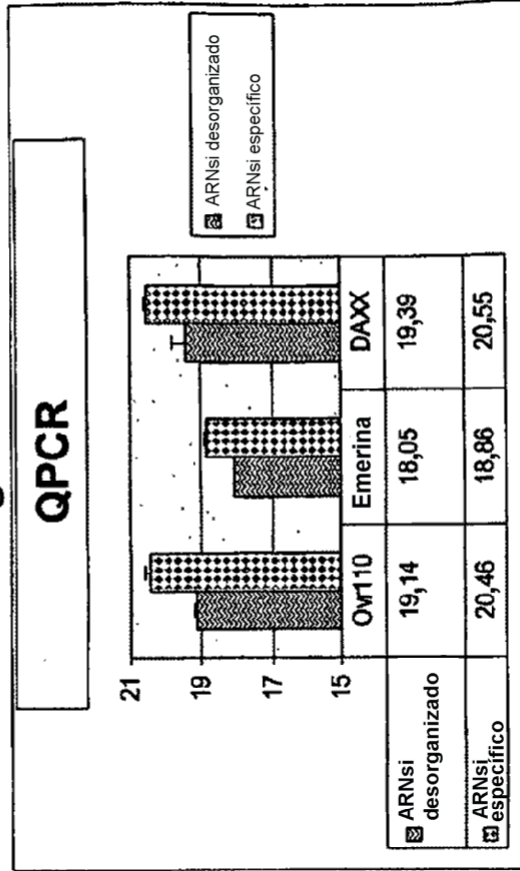
FIGURA 13: Silenciamiento de ARNm Ovr110 induce actividad caspasa en células SKBR3

Fig 13A.



DAXX: control positivo
Desorganizada: control negativo

Fig 13B.



$\Delta CT = 1,3$ silenciamiento de Ovr110 66 %

$\Delta CT = 1,2$ silenciamiento de DAXX 60%

FIGURA 14:
Sobreexpresión de Ovr110 potencia el crecimiento de xenoinjerto de tumor

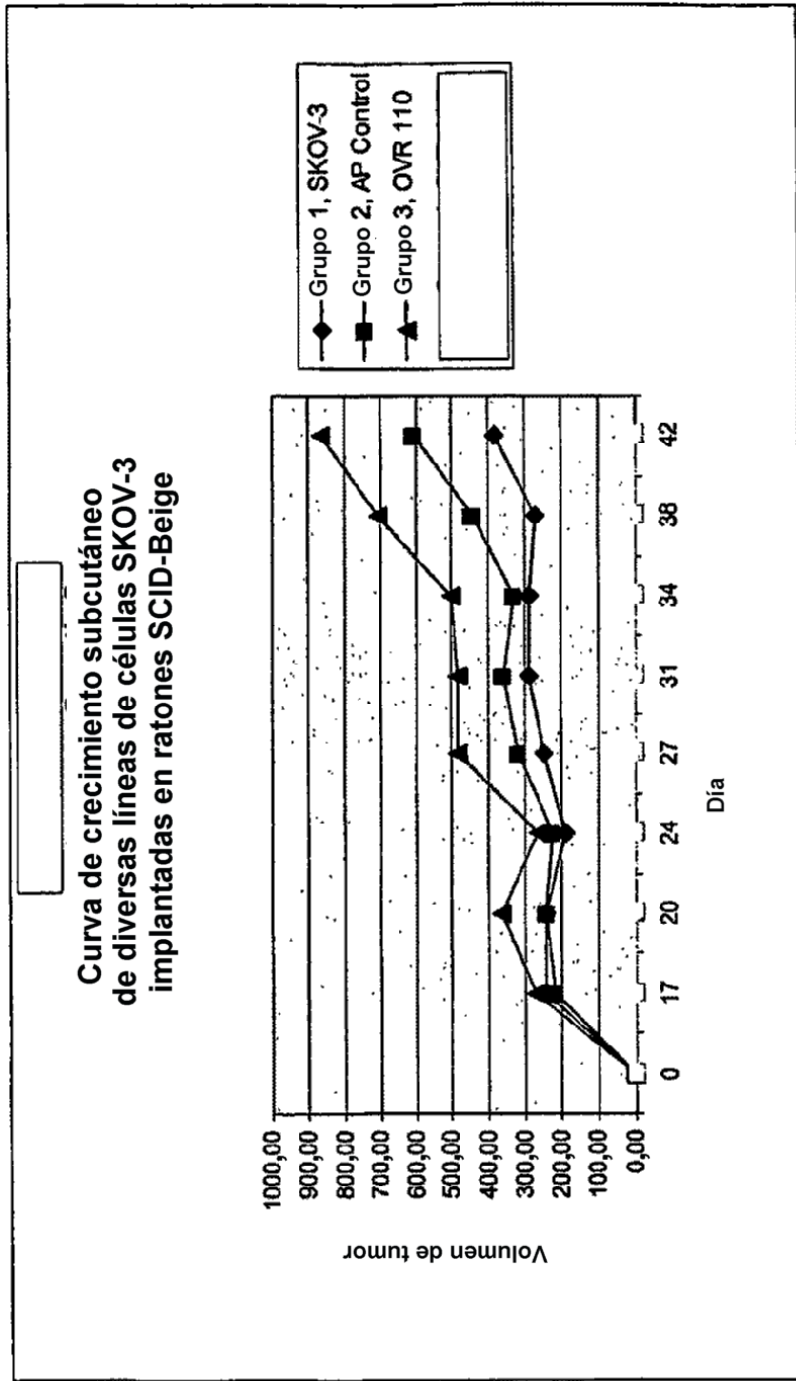


FIGURA 15:
Sobreexpresión de Ovr110 protege de apoptosis

Fig 15A.

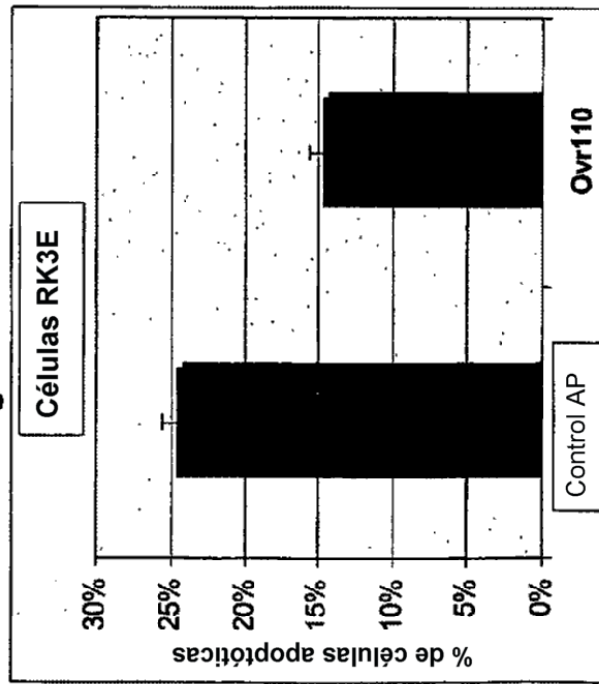
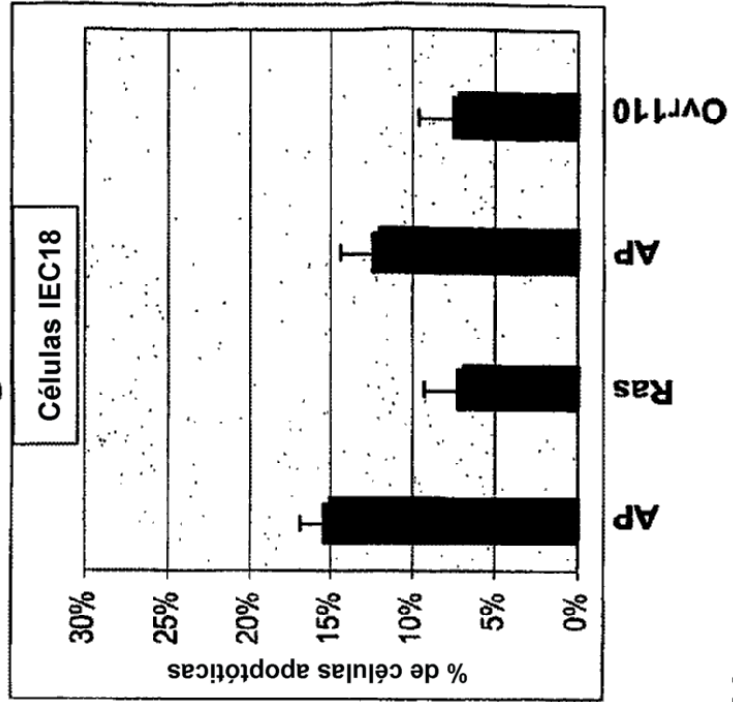


Fig 15B.



**Ensayo de Anoikis
(Medio sin FBS)**

FIGURA 16: Ovr110: Mapa de Epítopo

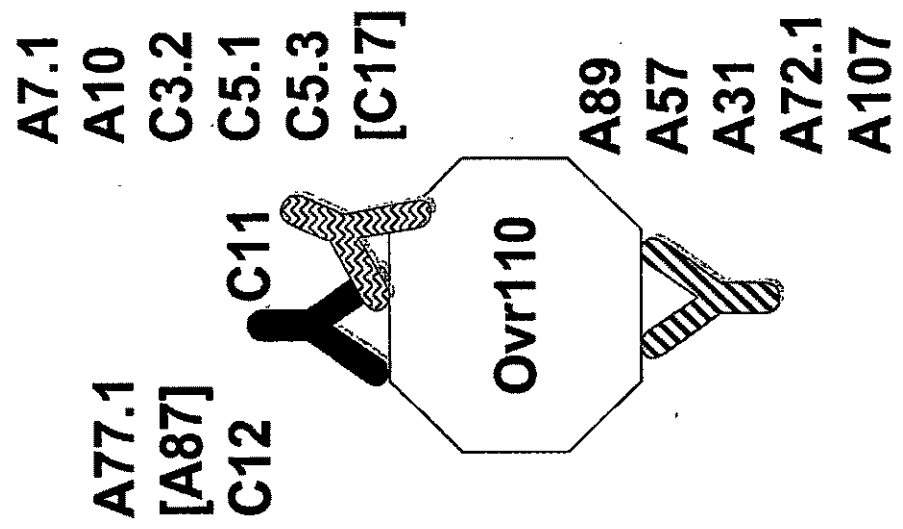
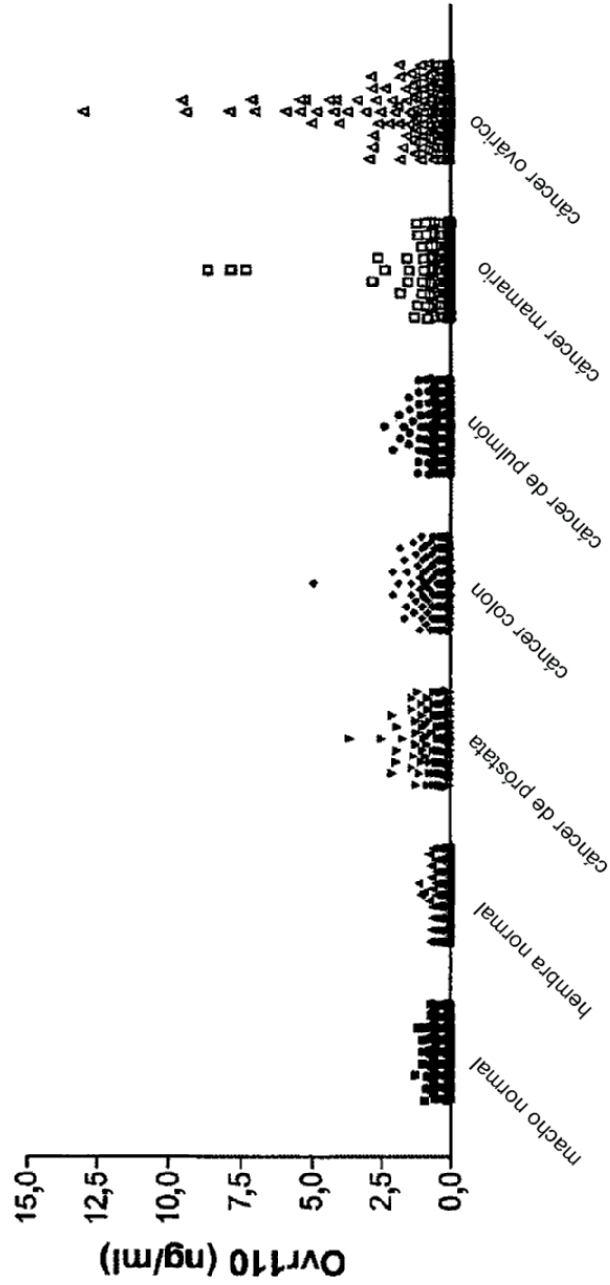
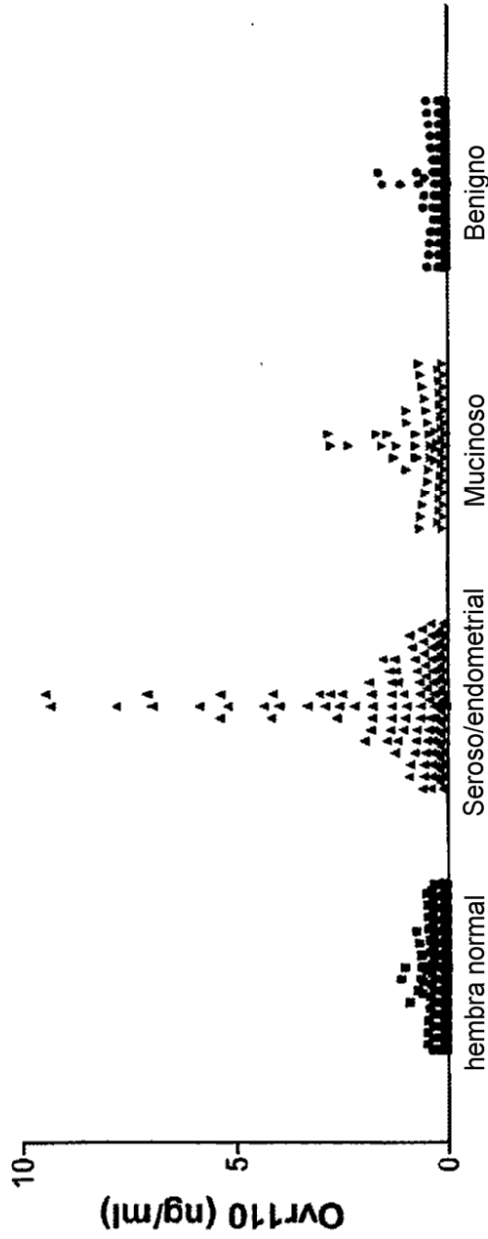


FIGURA 17
Detección de Ovr110 en suero de donantes sanos
y pacientes con cáncer



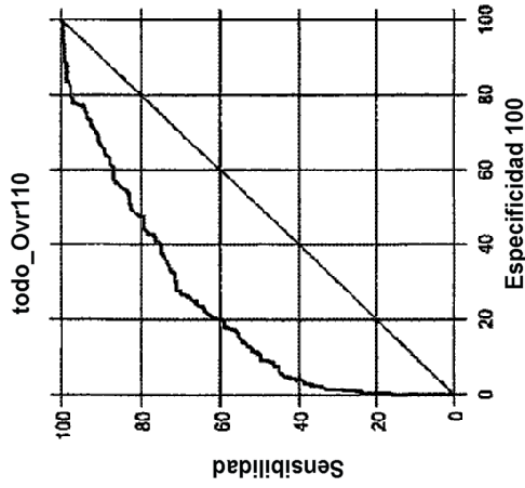
suero	macho normal	hembra normal	cáncer de próstata	cáncer de colon	cáncer de pulmón	cáncer mamario	cáncer ovárico
Nº de valores	281	260	146	198	370	260	248
Mínimo	0,0400	0,0290	0,0030	0,0080	0,0240	0,0400	0,0400
Percentil 25 %	0,1900	0,1295	0,1615	0,1780	0,1065	0,1240	0,2000
Mediana	0,2700	0,1960	0,3130	0,2935	0,1710	0,2275	0,3900
Percentil 75 %	0,4200	0,3115	0,6050	0,5720	0,3500	0,5305	0,9950
Máximo	1,280	1,133	3,614	4,935	2,402	8,616	12,94

FIGURA 18
Todo cáncer ovárico y muestras benignas



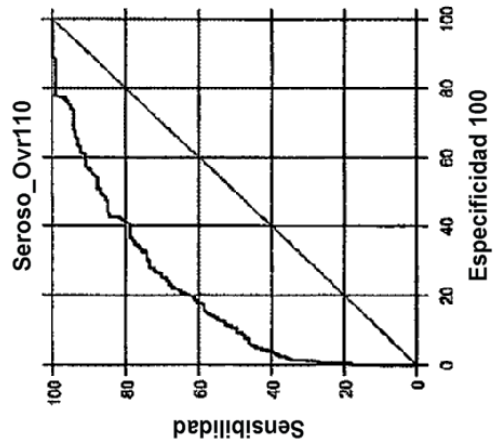
Etiquetas X	hembra normal	Seroso/endometrial	Mucinoso	Benigno
Nº de valores	260	147	64	150
Mínimo	0,0290	0,0420	0,0500	0,0130
Percentil 25 %	0,1295	0,2395	0,1625	0,0510
Mediana	0,1960	0,4100	0,3315	0,1165
Percentil 75 %	0,3115	1,275	0,7205	0,2170
Máximo	1,133	9,491	12,94	1,648

FIGURA 19: Curvas de COR de Ovr110 en cáncer ovárico



Todo cáncer ovárico
Área bajo la curva de COR = 0,78
Error típico = 0,020
Intervalo de confianza 95 % = 0,745 a 0,811

Fig 19A.



Cáncer ovárico seroso
Área bajo la curva de COR = 0,8
Error típico = 0,023
Intervalo de confianza 95 % = 0,770 a 0,838

Fig 19B.