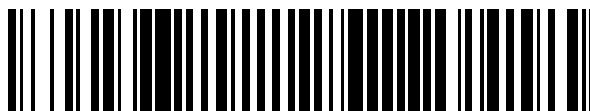


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 277**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2005 E 05848912 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 1817055**

54 Título: **Composiciones de anticuerpo contra Ovr110 y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

10.11.2004 US 626817 P

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

30.04.2013

73 Titular/es:

**DIADEXUS, INC. (100.0%)
343 OYSTER POINT BOULEVARD
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**PILKINGTON, GLENN;
KELLER, GILBERT-ANDRE;
LI, WENLU;
BURCHAM, TIMOTHY S.;
CORRAL, LAURA;
SIMON, IRIS y
PAPKOFF, JACKIE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 402 277 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 contra Ovr110 y procedimientos de uso

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones de anticuerpo anti-Ovr110, usos de las mismas y procedimientos in vitro para eliminar células cancerosas de ovario, páncreas, pulmón o mama que expresan Ovr110.

Antecedentes de la invención**Cáncer de ovario**

El cáncer de ovarios es la cuarta causa más común de muerte por cáncer en mujeres en los Estados Unidos, con más de 23.000 nuevos casos y casi 14.000 muertes previstas para el año 2001. Shridhar, V. y col., Cancer Res. 61(15): 5895-904 (2001); Memarzadeh, S. y Berek, J. S., J. Reprod. Med. 46(7): 621-29 (2001). La American Cancer Society (ACS) estima que habrá aproximadamente 25.580 nuevos casos de cáncer de ovario en 2004 y el cáncer de ovario causará aproximadamente 16.090 muertes en los Estados Unidos. Sitio web ACS: cáncer con la extensión .org del world wide web. Muchas mujeres mueren anualmente de cáncer de ovario que de todas las otras neoplasias ginecológicas combinadas. La incidencia de cáncer de ovario en los Estados Unidos se estima en 14,2 por 100.000 mujeres al año y 9 mujeres de cada 100.000 mueren cada año de cáncer de ovario. En 2004, aproximadamente el 70-75 % de los nuevos diagnósticos serán carcinoma en fase III y IV con una supervivencia prevista de 5 años de ~ el 15 %. Jemal y col., Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2001, with a Special Feature Regarding Survival. Cancer 2004; 101: 3-27. La incidencia del cáncer de ovario es de una gran preocupación en todo el mundo, con una estimación de 191.000 nuevos casos predichos anualmente. Runnebaum, I. B. y Stickeler, E., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127(2): 73-79 (2001). Desafortunadamente, las mujeres con cáncer de ovario normalmente son asintomáticas hasta que la enfermedad ha metastatizado. Como no existe una exploración eficaz para cáncer de ovario, casi el 70 % de las mujeres diagnosticadas tienen una fase avanzada del cáncer con una tasa de supervivencia de cinco años de ~25-30 %. Memarzadeh, S. y Berek, J. S., *supra*; Nunns, D. y col., Obstet. Gynecol. Surv. 55(12): 746-51. A la inversa, las mujeres diagnosticadas con cáncer de ovario en fase temprana disfrutan de tasas de supervivencia considerablemente mayores. Werness, B. A. y Eltabbakh, G. H., Int'l. J. Gynecol. Pathol. 20(1): 48-63 (2001). Aunque nuestra comprensión de la etiología del cáncer de ovario es incompleta, los resultados de investigaciones extensivas en este área apuntan a una combinación de factores de edad, genéticos, reproductivos, y de la dieta/ambientales. La edad es un factor de riesgo clave en el desarrollo de cáncer de ovario: aunque el riesgo de desarrollar cáncer de ovario antes de la edad de 30 es escaso, la incidencia de cáncer de ovario aumenta linealmente entre edades de 30 a 50, aumentando a una velocidad más lenta después de ello, estando la mayor incidencia entre las mujeres septuagenarias. Jeanne M. Schilder y col., Hereditary Ovarian Cancer: Clinical Syndromes and Management, en Ovarian Cancer 182 (Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001).

Con respecto a los factores genéticos, una historia familiar de cáncer de ovario es el factor de riesgo más significativo en el desarrollo de la enfermedad, dependiendo ese riesgo de la cantidad de miembros afectados en la familia, el grado de su relación con la mujer, y que parientes de primer grado particulares están afectados por la enfermedad. *Id.* Se han asociado mutaciones en varios genes con el cáncer de ovario, incluyendo BRCA1 y BRCA2, ambos cuales desempeñan una tarea clave en el desarrollo de cáncer de mama, así como hMSH2 y hMLH1, ambos cuales están asociados con cáncer de colon sin poliposis hereditario. Katherine Y. Look, Epidemiology, Etiology, y Screening of Ovarian Cancer, en Ovarian Cancer 169, 171-73 (Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001). BRCA1, localizado en el cromosoma 17, y BRCA2, localizado en el cromosoma 13, son genes supresores tumorales implicados en la reparación del ADN; mutaciones en estos genes están ligadas a casi el 10 % de los cánceres de ovario. *Id.* en 171-72; Schilder y col., *supra* en 185-86. hMSH2 y hMLH1 están asociados con la reparación de desapareamientos del ADN, y están localizados en los cromosomas 2 y 3, respectivamente; se ha informado que casi el 3 % de los carcinomas de ovario hereditarios se deben a mutaciones en estos genes. Véase, *supra* en 173; Schilder y col., *supra* en 184, 188-89.

También se han asociado factores reproductivos con un riesgo aumentado o reducido de cáncer de ovario. La menopausia tardía, la nuliparidad, y la edad temprana en la primera menstruación se han ligado todos con un elevado riesgo de cáncer de ovario. Schilder y col., *supra* en 182: una teoría hipotética que estos factores aumentan la cantidad de ciclos ovulatorios durante el transcurso de la vida de una mujer, conduciendo a una "ovulación incesante", que se cree que es la causa principal de mutaciones en el epitelio del ovario. *Id.*; Laura J. Havrilesky y Andrew Berchuck, Molecular Alterations in Sporadic Ovarian Cancer, en Ovarian Cancer 25 (Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001). Las mutaciones pueden explicarse por el hecho de que la ovulación provoca la destrucción y reparación de ese epitelio, necesitando una división celular aumentada, aumentando de este modo la posibilidad de que suceda una mutación indetectada. *Id.* Puede hallarse soporte a esta teoría en el hecho de que el embarazo, la lactancia, y el uso de anticonceptivos orales, todos los cuales suprimen la ovulación, confieren un efecto protector con respecto al desarrollo de cáncer de ovario. *Id.*

Entre los factores de la dieta/ambientales, parecería que hay una asociación entre la alta ingesta de grasa animal y carne roja y cáncer de ovario, aunque la vitamina A antioxidante, que evita la formación de radicales libres y también

ayuda a mantener la diferenciación celular normal, puede ofrecer un efecto protector. Véase, *supra* en 169. Informes también han asociado asbestos y el trisilicato de magnesio hidro (talco), el último de los cuales puede estar presente en diafragmas y compresas sanitarias. *Id.* en 169-70.

Los procedimientos de exploración actuales para cáncer de ovario, aunque son de alguna utilidad, están bastante limitados en su capacidad de diagnóstico, un problema que es particularmente agudo en fases tempranas del progreso del cáncer cuando la enfermedad es normalmente asintomática pero se trata más fácilmente. Walter J. Burdette, *Cancer: Etiology, Diagnosis, and Treatment* 166 (1998); Memarzadeh y Berek, *supra*; Runnebaum y Stickeler, *supra*; Werness y Eltabbakh, *supra*. Los ensayos de exploración habitualmente usados incluyen examen pélvico retrovaginal bianual, radioinmunoensayo para detectar el marcador tumoral sérico CA-125, y ultrasonografía transvaginal. Burdette, *supra* en 166. Actualmente, CA-125 es el único marcador sérico clínicamente aprobado para su uso en cáncer de ovario. CA-125 se halla elevado en la mayoría de los cánceres serosos, pero está elevado en solamente la mitad de aquella mujeres con enfermedad en fase temprana. La aplicación clínica principal de CA-125 es en el control del éxito del tratamiento o la detección de recurrencia en mujeres que experimentan tratamiento para cáncer de ovario. Markman M. *The Oncologist*; 2: 6-9 (1997). El uso de CA-125 como marcador de exploración está limitado porque está frecuentemente elevado en mujeres con enfermedades benignas tales como endometriosis. Por tanto, existe una necesidad crítica de nuevos marcadores séricos que sean más sensibles y específicos para la detección de cáncer de ovario cuando se usan solos, o en combinación con CA-125. Bast RC. y col., *Early Detection of Ovarian Cancer: Promise and Reality in Ovarian Cancer*. *Cancer Research and Treatment* Vol. 107 (Stack MS, Fishman, DA, eds., 2001).

El examen pélvico no ha logrado producir cantidades adecuadas de diagnósticos tempranos, y los otros procedimientos no son suficientemente precisos. *Id.* Un estudio informó de que solamente el 15 % de las pacientes que padecían cáncer de ovario se diagnosticaron con la enfermedad en el momento de su examen pélvico. Véase, *supra* en 174. Además, el ensayo de CA-125 es propenso a dar falsos positivos en mujeres pre-menopáusicas y se ha informado de que son de bajo valor predictivo en mujeres post-menopáusicas. *Id.* en 174-75. Aunque la ultrasonografía transvaginal ahora es el procedimiento preferido para explorar el cáncer de ovario, es incapaz de distinguir fiablemente entre tumores benignos y malignos, y tampoco puede localizar las neoplasias peritoneales primarias o el cáncer de ovario si el tamaño del ovario es normal. Schilder y col., *supra* at 194-95. Aunque el ensayo genético para mutaciones de los genes BRCA1, BRCA2, hMSH2, y hMLH1 están ahora disponibles, estos ensayos pueden ser demasiado costosos para algunos pacientes y también pueden producir falsos negativos o resultados indeterminados. Schilder y col., *supra* en 191-94.

Además, los esfuerzos actuales se centran en la identificación de paneles de biomarcadores que pueden usarse en combinación. Bast RC Jr., *J Clin Oncol* 2003; 21: 200-205. Actualmente, otros marcadores que se están evaluando como potenciales marcadores séricos de ovario que pueden servir como miembros de un panel de múltiples marcadores para mejorar la detección del cáncer de ovario son HE4; mesotelina; calicreina 5, 8, 10 y 11; y prostasina. Urban y col. *Ovarian cancer screening Hematol Oncol Clin North Am.* Agosto 2003; 17(4):989-1005; Hellstrom y col. *The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma*, *Cancer Res.* Julio 2003 1;63(13):3695-700; Ordonez, *Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis*, *Am J Surg Pathol.* Noviembre 2003; 27(11):1418-28; Diamandis EP y col., *Cancer Research* 2002; 62: 295-300; Yousef GM y col., *Cancer Research* 2003; 63: 3958-3965; Kishi T y col., *Cancer Research* 2003; 63: 2771-2774; Luo LY y col., *Cancer Research* 2003; 63: 807-811; Mok SC y col., *J Natl Cancer Inst* 2001; 93 (19): 1437-1439.

La estadificación de cáncer de ovario, que se consigue a través de exploración quirúrgica, es crucial en la determinación del transcurso de tratamiento y el tratamiento de la enfermedad. *AJCC Cancer Staging Handbook* 187 (Irvin D. Fleming y col. eds., 5ª ed. 1998); Burdette, *supra* en 170; Memarzadeh y Berek, *supra*; Shridhar y col., *supra*. La estadificación se realiza por referencia al sistema de clasificación desarrollado por la International Federation of Gynecology and Obstetrics. David H. Moore, *Primary Surgical Management of Early Epithelial Ovarian Carcinoma*, en *Ovarian Cancer* 203 (Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001); Fleming y col. eds., *supra* en 188. El cáncer de ovario en fase I se caracteriza por un crecimiento tumoral que está limitado a los ovarios y está compuesto de tres subfases. *Id.* En la subfase IA, el crecimiento tumoral está limitado a un ovario, no hay tumor en la superficie externa del ovario, la cápsula del ovario está intacta, y no hay células malignas presentes en fluido ascítico o lavados peritoneales. *Id.* La subfase IB es idéntica a IA, excepto que el crecimiento tumoral 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 sobre la superficie de uno o ambos ovarios, y células malignas presentes en fluido ascítico o lavados peritoneales. *Id.*

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

El cáncer de ovario en fase III implica crecimiento tumoral en uno o ambos ovarios, con metástasis peritoneal más allá de la pelvis confirmada por microscopía y/o metástasis en los ganglios linfáticos regionales. *Id.* La subfase IIIA

está caracterizada por metástasis peritoneal microscópica fuera de la pelvis, implando la subfase IIIB metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis 2 cm o menos en su mayor dimensión. *Id.* La subfase IIIC es idéntica a IIIB, excepto que la metástasis es mayor de 2 cm en su mayor dimensión y puede incluir metástasis a los ganglios linfáticos regionales. *Id.* Finalmente, la fase IV se refiere a la presencia de metástasis distante, excluyendo metástasis peritoneal. *Id.*

Aunque la determinación quirúrgica de la fase es actualmente el punto de referencia para evaluar el manejo y tratamiento del cáncer de ovario, tiene varios inconvenientes considerables, incluyendo la invasividad del procedimiento, el potencial de complicaciones, así como el potencial de imprecisión. Moore, *supra* en 206-208, 213. En vista de estas limitaciones, se ha prestado atención en el desarrollo de metodologías alternativas para la estadificación a través de la comprensión de la expresión génica diferencial en diversas fases del cáncer de ovario y obteniendo diversos biomarcadores para ayudar a una mejor evaluación del progreso de la enfermedad. Vartiainen, J. y col., *Int'l J. Cancer*, 95(5): 313-16 (2001); Shridhar y col. *supra*; Baekelandt, M. y col., *J. Clin. Oncol.* 18 (22): 3775-81.

El tratamiento del cáncer de ovario normalmente implica un ataque multiobjetivo, con intervención quirúrgica que sirve como fundamento de tratamiento. Dennis S. Chi y William J. Hoskins, *Primary Surgical Management of Advanced Epithelial Ovarian Cancer*, en *Ovarian Cancer* 241 (Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001). Por ejemplo, en el caso de cáncer de ovario epitelial, que representa ~90 % de los casos de cáncer de ovario, el tratamiento normalmente consta de: (1) cirugía citorreductora, incluyendo histerectomía abdominal total, salpingo-ovorectomía bilateral, omentectomía, y linfadenectomía, seguido por (2) quimioterapia adyuvante con paclitaxel y cisplatino o carboplatino. Eltabbakh, G.H. y Awtrey, C.S., *Expert Op. Pharmacother.* 2(10): 109-24. A pesar de la tasa de respuesta clínica del 80 % a la terapia adyuvante, la mayoría de los pacientes experimentan recurrencia tumoral en tres años desde el tratamiento. *Id.* Ciertos pacientes pueden experimentar una segunda cirugía citorreductora y/o quimioterapia de segunda línea. Memarzadeh y Berek, *supra*.

A partir de lo anterior, queda claro que procedimientos usados para detectar, diagnosticar, controlar, determinar la fase, pronosticar, y prevenir la recurrencia del cáncer de ovario son de importancia crítica para el resultado del paciente. Además, los procedimientos actuales, aunque ayudan en cada uno de estos análisis, están limitados por su especificidad, sensibilidad, invasividad, y/o su coste. Por tanto, serían altamente deseables procedimientos muy específicos y sensibles que funcionaran mediante la detección de nuevos marcadores en células, tejidos, o fluidos corporales, con invasividad mínima y a un coste razonable.

Por consiguiente, existe una gran necesidad de procedimientos más sensibles y precisos para predecir si una persona tiene probabilidad de desarrollar cáncer de ovario, para diagnosticar el cáncer de ovario, para controlar el progreso de la enfermedad, para determinar la fase del cáncer de ovario, para determinar si el cáncer de ovario ha metastatizado, y para la formación de imágenes del cáncer de ovario. También existe la necesidad de un mejor tratamiento del cáncer de ovario.

Cáncer de mama

El cáncer de mama, también conocido como cáncer tumoral mamario, es el segundo cáncer más común entre las mujeres, representando un tercio de los cánceres diagnosticados en los Estados Unidos. Una de cada nueve mujeres desarrollará cáncer de mama en su vida y se diagnostican aproximadamente 192.000 nuevos casos de cáncer de mama 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 de mama es extremadamente raro en mujeres más jóvenes de 20 y es muy raro en mujeres por debajo de 30. La incidencia del cáncer de mama aumenta con la edad y llega a ser significativo a la edad de 50. Las mujeres blancas no hispanas tienen la mayor tasa de incidencia de cáncer de mama y las mujeres coreanas tienen la más baja. La prevalencia aumentada de las mutaciones genéticas BRCA1 y BRCA2 que promueven cánceres de mama y otros cánceres se encuentra en judíos askenazíes. Las mujeres afroamericanas tienen la mayor tasa de mortalidad por cáncer de mama entre estos mismos grupos (31 por 100.000), mientras que las mujeres chinas tienen la menor a 11 por 100.000. Aunque los hombres pueden tener cáncer de mama, esto es extremadamente raro. En los Estados Unidos se estima que habrá 217.440 nuevos casos de cáncer de mama y 40.580 muertes debido a cáncer de mama en 2004. (American Cancer Society Website: cáncer con la extensión .org del world wide web). Con la excepción de aquellos casos con factores genéticos asociados, las causas precisas del cáncer de mama no son conocidas.

En el tratamiento del cáncer de mama, se presta mucha atención sobre la detección y la evaluación del riesgo porque una detección temprana y precisa de la fase de cáncer de mama tiene un impacto significativo sobre la supervivencia. Por ejemplo, un cáncer de mama detectado en una fase temprana (fase T0, analizada a continuación) tiene una tasa de supervivencia de cinco años del 92 %. A la inversa, si el cáncer no se detecta hasta una fase tardía (es decir, fase T4 (IV)), la tasa de supervivencia de cinco años se reduce al 13 %. *AJCC Cancer Staging Handbook* pág. 164-65 (Irvin D. Fleming y col. eds., 5ª ed. 1998). Algunas técnicas de detección, tales como mamografía y biopsia, implican un malestar, gastos, y/o radiación aumentados, y solamente se prescriben únicamente a pacientes con un riesgo aumentado de cáncer de mama.

Los procedimientos actuales para predecir o detectar el riesgo de cáncer de mama no son óptimos. Un procedimiento para predecir el riesgo relativo de cáncer de mama es examinando los factores de riesgo del paciente y persiguiendo regímenes de diagnóstico y tratamiento agresivos para pacientes de alto riesgo. El riesgo de cáncer de mama de un paciente se ha asociado positivamente con el aumento de la edad, nuliparidad, la historia familiar de cáncer de mama, la historia personal de cáncer de mama, menstruación temprana, menopausia tardía, edad tardía del primer embarazo a término, las enfermedades previas proliferativas de mama, la irradiación de la mama a una edad temprana y una historia personal de neoplasias. Los factores relacionados con el estilo de vida tales como el consumo de grasas, el consumo de alcohol, la educación, y el estatus socioeconómico también se han asociado con la incidencia aumentada de cáncer de mama aunque no se ha establecido una relación directa entre la causa y el efecto. Aunque estos factores de riesgo son estadísticamente significativos, su débil asociación con el cáncer de mama limitó su utilidad. La mayoría de las mujeres que desarrollan cáncer de mama no tienen ninguno de los factores de riesgo enumerados anteriormente, salvo el riesgo que proviene de envejecer. Publicación NIH N° 00-1556 (2000).

Los procedimientos de exploración actuales para detectar el cáncer, tales como el auto examen de mama, ultrasonidos, y mamografía tienen inconvenientes que reducen su eficacia o evitan su adopción extendida. Los auto exámenes de mama, aunque útiles, no son fiables para la detección de cáncer de mama en las fases iniciales donde el tumor es pequeño y difícil de detectar por palpación. Las mediciones de ultrasonido requieren operarios especializados a un gasto aumentado. La mamografía, aunque sensible, está sujeta al diagnóstico excesivo en la detección de lesiones que tienen un cuestionable potencial maligno. También existe el miedo de la radiación usada en mamografía porque la radiación previa en el tórax es un factor asociado con una incidencia aumentada de cáncer de mama.

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

Varios marcadores genéticos se han asociado con cáncer de mama. 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 (Esteve y Fritsche, Serum and Tissue Markers for Breast Cancer, en Breast Cancer, 286-308 (2001)). Estos marcadores tienen problemas con la sensibilidad limitada, la baja correlación, y los falsos negativos que limitan su uso para un diagnóstico inicial. Por ejemplo, aunque la mutación del gen BRCA1 es útil como indicador de un riesgo aumentado para cáncer de mama, tiene uso limitado en el diagnóstico del cáncer porque solamente el 6,2 % de los cánceres de mama son BRCA1 positivos. Malone y col., JAMA 279: 922 (1998). Véase también, Mewman y col., JAMA 279:915 (1998) (correlación de solamente el 3.3 %).

Existen cuatro clasificaciones principales de cáncer de mama que varían por el sitio de origen y el grado de desarrollo de la enfermedad.

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

II. Carcinoma ductal invasivo (IDC): neoplasia de las células epiteliales ductales que penetra a través de la membrana basal y al interior del tejido de soporte de la mama. El IDC puede finalmente propagarse a otra parte en el cuerpo.

III. Carcinoma lobular in situ (LCIS): neoplasia que surge en un lóbulo individual de la mama que no logra extenderse a través de la pared del lóbulo, generalmente permanece localizado.

IV. Carcinoma lobular infiltrante (ILC): neoplasia que surge en un lóbulo individual de la mama e invade directamente a través de la pared del lóbulo a tejidos adyacentes. En virtud de esta invasión más allá de la pared del lóbulo, el ILC puede penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos y propagarse a sitios distantes.

Para el propósito de determinar el pronóstico y el tratamiento, estos cuatro tipos de cáncer de mama se han estadiado de acuerdo con el tamaño del tumor primario (T), la implicación de los ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M). Aunque el DCIS por definición representa una enfermedad localizada en fase I, las otras formas de cáncer de mama pueden variar de fase II a fase IV. Existen factores adicionales de pronóstico que sirven adicionalmente para guiar la intervención quirúrgica y médica. Los más habituales son la cantidad total de ganglios linfáticos implicados, el estado ER (receptor de estrógenos), el estado del receptor Her2/neu y los grados histológicos.

Los cánceres de mama se diagnostican en las categorías de fase apropiadas que reconocen que diferentes tratamientos son más eficaces para diferentes fases del cáncer. La fase TX indica que el tumor primario no puede evaluarse (es decir, el tumor se retiró o se retiró el tejido mamario). La fase T0 se caracteriza por anomalías tales como hiperplasia pero sin evidencias de tumor primario. La fase 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 tener un tumor de 2 cm o menos en su mayor dimensión. En la fase T1, Tmic indica microinvación

de 0,1 cm o menos, T1a indica un tumor entre 0,1 a 0,5 cm, T1b indica un tumor entre 0,5 a 1 cm, y T1c indica tumores entre 1 cm a 2 cm. La fase T2 (II) se caracteriza por tumores de 2 cm a 5 cm en su mayor dimensión. Los tumores mayores de 5 cm de tamaño se clasifican como T3 (III). La fase T4 (IV) indica un tumor de cualquier tamaño con extensión a la pared o la piel torácica. En la fase T4, T4a indica extensión del tumor a la pared torácica, T4b indica edema o ulceración de la piel de la mama o los nódulos cutáneos satélite confinados a la misma mama, T4c indica una combinación de T4a y T4b, y T4d indica carcinoma inflamatorio. AJCC Cancer Staging Handbook pág. 159-70 (Irvin D. Fleming y col. eds., 5ª ed. 1998). Además de la determinación convencional de la fase, los tumores de mama pueden clasificarse de acuerdo con su estado proteico de receptor de estrógenos y receptor de progesterona. Fisher y col., Breast Cancer Research and Treatment 7:147 (1986). También puede ser útil un estado patológico adicional, tal como el estado HER2/neu. 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 estadificación del tumor primario, puede determinarse la fase de la metástasis del cáncer de mama a ganglios linfáticos regionales. La fase NX indica que los ganglios linfáticos no pueden evaluarse (por ejemplo, se han retirado previamente). La fase N0 indica ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales. La fase N1 indica metástasis a ganglios linfáticos axilares ipsilaterales móviles. La fase N2 indica metástasis a los ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijados a otros o a otras estructuras. La fase N3 indica metástasis a ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales. *Id.*

La estadificación tiene valor pronóstico potencial y proporciona criterios para diseñar la terapia óptima. Simpson y col., J. Clin. Oncology 18:2059 (2000). Generalmente, la estadificación patológica del cáncer de mama es preferible para la estadificación clínica porque lo anterior da un pronóstico más preciso. Sin embargo, la estadificación de la fase clínica se preferiría si fuera tan precisa como la estadificación patológica porque no depende de un procedimiento invasivo para obtener tejido para la evaluación patológica. La estadificación del cáncer de mama se mejoraría detectando nuevos marcadores en células, tejidos, o fluidos corporales que podrían diferenciar entre diferentes fases de invasión. El progreso en este campo permitirá un procedimiento más rápido y fiable para tratar pacientes de cáncer de mama.

El tratamiento del cáncer de mama se decide generalmente después de una estadificación precisa del tumor primario. Las opciones de tratamiento primario incluyen terapia de conservación de la mama (lumpectomía, irradiación de la mama, y estadificación quirúrgica de la axila), y mastectomía radical modificada. Los tratamientos adicionales incluyen quimioterapia, irradiación regional y, en casos extremos, terminación de la producción de estrógenos por ablación ovárica.

Hasta recientemente, el tratamiento acostumbrado para todos los cánceres de mama era 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 supervivencia, para cáncer de mama en fase temprana. Fisher y col., J. of Clinical Oncology 16:441 (1998). Las opciones de tratamiento para un paciente con cáncer de mama en fase temprana (es decir, fase Tis) puede ser cirugía de conservación de la mama seguido por radioterapia localizada en la mama. Como alternativa, puede emplearse mastectomía opcionalmente acoplada con radiación o reconstrucción de la mama. Estos procedimientos de tratamiento son igualmente eficaces en las fases tempranas del cáncer de mama.

Los pacientes con cáncer de mama en fase I y fase II requieren cirugía con quimioterapia y/o terapia hormonal. La cirugía es de uso limitado en pacientes en fase III y fase IV. Por tanto, estos pacientes son mejores candidatos para quimioterapia y radioterapia con cirugía limitada a biopsia para permitir una estadificación inicial o la posterior re-estadificación porque el cáncer es raramente curativo en esta fase de la enfermedad. AJCC Cancer Staging Handbook 84, 164-65 (Irvin D. Fleming y col. eds., 5ª ed. 1998).

En un esfuerzo por proporcionar más opciones de tratamiento a los pacientes, se están realizando esfuerzos para definir una fase más temprana del cáncer de mama con baja recurrencia que podría tratarse con lumpectomía sin tratamiento de radiación postoperatorio. Aunque se han hecho varios intentos por clasificar el cáncer de mama en fase temprana, no se han obtenido recomendaciones consensuadas sobre el 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).

Cáncer pancreático

El cáncer pancreático es el decimotercer cáncer más común y la octava causa mayoritaria de muerte por cáncer en todo el mundo. Donghui Li, Molecular Epidemiology, en Pancreatic Cancer 3 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002). En los Estados Unidos, el cáncer de páncreas es el cuarto cáncer más común tanto en hombres como en mujeres, representando el 5 % de las muertes por cáncer y casi 30.000 muertes globalmente. *Id.* Los índices de cáncer pancreático son mayores en hombres que en mujeres y mayores en afroamericanos frente a los caucásicos. *Id.* en 9. El indicador más significativo de cáncer pancreático es la edad del paciente; entre los caucásicos, la incidencia relacionada con la edad de cáncer pancreático aumenta continuamente, incluso los 85 y categorías mayores. *Id.* en 3. Aproximadamente el 80 % de los casos suceden en el intervalo de edad de 60 a 80, experimentando aquellos a

partir de los 80 un riesgo de adquirir la enfermedad 40 veces la de aquellos de más de 40. *Id.* Además, la American Cancer Society estima que habrá aproximadamente 31.800 nuevos casos de cáncer pancreático en 2004 solamente en los Estados Unidos. El cáncer pancreático causará aproximadamente 31.200 muertes en los Estados Unidos en el mismo año. Sitio web ACS: cáncer con la extensión .org del world wide web. A pesar de los esfuerzos de los investigadores y los médicos en idear tratamientos para el cáncer pancreático sigue siendo casi universalmente fatal. James R Howe, Molecular Markers as a Tool for the Early Diagnosis of Pancreatic Cancer, in Pancreatic Cancer 29 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002).

Además de la edad, se han identificado varios factores de riesgo para cáncer pancreático, incluyendo el hábito de fumar, la dieta, la ocupación, ciertas afecciones médicas, la herencia genética, y la biología molecular. El hábito de fumar es el factor de riesgo más importante para adquirir la enfermedad, estableciéndose el enlace entre el hábito de fumar y el cáncer pancreático en numerosos estudios. Li, *supra* en 3. El riesgo relativo representa al menos un 1,5, aumentando con el nivel de fumar a una proporción de riesgo externa de 10 veces. *Id.* El siguiente factor más importante parecería ser la dieta, con un riesgo aumentado asociado con una ingesta de proteínas y grasas animales, y un riesgo disminuido asociado con una ingesta de frutas y vegetales. *Id.* en 3-4. En cuanto a las ocupaciones particulares, tasas excesivas de cáncer pancreático se han asociado con trabajadores en la química, exploración de carbón y gas, la industria metalúrgica, el curtido de cuero, textiles, el procesamiento de aluminio, y transporte. *Id.* en 4. Varias afecciones médicas también se han asociado con una incidencia aumentada de cáncer pancreático, incluyendo la diabetes, la pancreatitis crónica, la gastrectomía, y colecistectomía, aunque la relación causa y efecto entre estas afecciones y el cáncer pancreático no se ha establecido. *Id.*

Los factores genéticos hereditarios comprenden menos del 10 % de la carga del cáncer pancreático, con asociaciones documentadas con pancreatitis hereditaria, así como mutaciones en la línea germinal en genes del síndrome de cáncer familiar tales como *hMSH2* y *hMLH1* (cáncer de colon no de poliposis hereditario), *p16* (melanoma lunar múltiple atípico familiar) y *BRCA1/BRCA2* (cáncer de mama y ovario). *Id.* en 3. Aunque ningún otro órgano tiene una base hereditaria mayor para el cáncer que el páncreas, los investigadores han sido incapaces de identificar el defecto o defectos genéticos particulares que contribuyen a la susceptibilidad al cáncer pancreático. David H. Berger y William E. Fisher, Inherited Pancreatic Cancer Syndromes, en Pancreatic Cancer 73 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002).

Desde el punto de vista de biología molecular, las investigaciones han revelado una asociación entre el cáncer pancreático y varias mutaciones genéticas, incluyendo la activación del proto-oncogén *K-ras* y la activación de los genes supresores tumorales *p53*, *p16*, y *DPC4*. Marina E. Jean y col., The Molecular Biology of Pancreatic Cancer, en Pancreatic Cancer 15 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002).

En un estudio de adenocarcinomas pancreáticos, el 83 % poseían la activación *K-ras* junto con la inactivación de *p16* y *p53*. *Id.* Se hallan mutaciones *K-ras* en el 80 al 95 % de los adenocarcinomas pancreáticos, siendo los genes *p53*, *p16*, y *DPC4* los genes supresores tumorales más frecuentemente suprimidos en cáncer del páncreas. Howe, *supra* en 29. Supresiones homocigóticas, hipermetilación, y mutaciones del gen *p16* se han descubierto en el 85 al 98 % de los adenocarcinomas del páncreas. *Id.* Como podría esperarse por el papel de las alteraciones en los genes *K-ras*, *p53*, *p16*, y *DPC4*, la pérdida de la regulación del ciclo celular parecería ser clave para la tumorigénesis en el páncreas, y puede explicar porqué este cáncer es tan agresivo. Jean, *supra* en 15. Las investigaciones también han revelado una relación entre este cáncer y la regulación anormal de ciertos factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento, así como una regulación positiva de las metaloproteinasas de matriz y los reguladores de la angiogénesis tumoral. *Id.* El factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento transformante β , el factor de crecimiento tipo insulina, el factor de crecimiento de hepatocitos, y el factor de crecimiento del endotelio vascular pueden desempeñar diversas tareas en el cáncer pancreático, aunque dichas tareas no se han dilucidado. *Id.* en 18-22.

El desarrollo de técnicas de exploración para detectar la presencia de cáncer pancreático es particularmente esencial para este cáncer mortífero, ya que la mayoría de los pacientes no logran presentarse hasta que sus tumores pancreáticos obstruyen el conducto biliar o inducen dolor, punto en el cual los tumores han invadido los vasos capilares y linfáticos que rodean el páncreas, Howe, *supra* en 29; desafortunadamente, los pacientes con la forma metastásica de la enfermedad normalmente sobreviven menos de un año después del diagnóstico, Jean y col., *supra* en 15. Aunque la tomografía computarizada (CT) y la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP) pueden ayudar al diagnóstico de los pacientes sintomáticos, actualmente no existe herramienta para explorar los tumores pancreáticos que permitiera su descubrimiento temprano, punto en el cual podrían ser curables. Howe, *supra* en 29. Marcadores tales como el antígeno carcinoembrionario, y anticuerpos generados contra líneas celulares de cáncer colónico humano (CA 19-9 y CA 195), cáncer de ovario humano (CA 125), y cáncer pancreático humano (SPAN-1 y DUPAN-2) pueden elevarse en el suero de pacientes con cáncer pancreático, pero estos marcadores no son suficientemente fiables para servir como herramientas de exploración debido a su ausencia de especificidad y aparición tardía en la enfermedad. Walter J. Burdette, Cancer: Etiology, Diagnosis, and Treatment 99 (1998); Hasholzner, U. y col., Anticancer Res. 19(4A): 2477-80 (1999).

Debido a la presente ausencia de procedimientos de exploración adecuados, los médicos se están volviendo cada vez más a técnicas que emplean procedimientos de biología molecular como medios más prometedores para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Howe, *supra* en 30. Actualmente, no existe un marcador de alta

sensibilidad, altamente específico que posibilite la detección de cáncer pancreático en individuos asintomáticos, pero están bajo investigación varios marcadores biológicos. *Id.* Actualmente se están centrando esfuerzos considerables en K-ras, ideando los investigadores técnicas para explorar muestras de jugo pancreático, bilis, jugo duodenal, o ERCP con cepillo para detectar mutaciones K-ras. *Id.* Como la recogida de estas muestras es invasiva y no particularmente de ayuda en la exploración de aquellos que son asintomáticos, los investigadores también se han centrado en análisis séricos y de deposiciones para mutaciones K-ras, siendo lo primero lo más prometedor, ya que lo último está impedido por la complejidad del material fuente. *Id.* en 35-38, 42. Además, como los niveles séricos de la proteína de factor de transcripción p53 pueden ser paralelos a la progresión del cáncer, p53 se está estudiando así mismo como marcador tumoral posible. *Id.* en 37; Jean y col., *supra* en 17.

Una vez que se ha diagnosticado el cáncer pancreático, se toman decisiones de tratamiento en referencia a la fase de la progresión del cáncer. Se emplean varias técnicas de formación de imágenes para estadificar el cáncer pancreático, siendo la tomografía computarizada (CT) el procedimiento presente de elección, Harmeet Kaur y col., *Pancreatic Cancer: Radiologic Staging*, en *Pancreatic Cancer* 86 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002); Ishiguchi, T. y col., *Hepatogastroenterology* 48(40): 923-27 (2001), a pesar del hecho de que frecuentemente infra estime el grado del cáncer, ya que metástasis de pequeño volumen a menudo están más allá de la resolución del CT, H. J. Kim y K. C. Conlon, *Laparoscopic Staging*, en *Pancreatic Cancer* 15 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002). La MRI puede en algún grado suplantar la CT en vista de, entre otros, su capacidad de (1) contrastar entre diversos tejidos, (2) modificar la secuencias de pulso para mejorar la visualización de las lesiones y minimizar los artefactos, (3) realizar imágenes limitando al mismo tiempo la exposición del paciente a radiación ionizante, y (4) visualizar vasos sin usar reactivos de contraste iodados IV. Kaur y col., *supra* en 87. Actualmente, sin embargo, la MRI no ha demostrado una clara ventaja sobre la CT. Kim y Conlon, *supra* en 116.

Actualmente también se están empleando una diversidad de técnicas ultrasónicas en la estadificación, incluyendo ultrasonidos transabdominales (TUS), ultrasonidos endoscópicos (EUS), y ultrasonidos intraoperatorios (IUS), siendo EUS uno de los más prometedores. Kaur y col., *supra* en 86; Richard A. Erickson, *Endoscopic Diagnosis and Staging: Endoscopic Ultrasound, Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography*, en *Pancreatic Cancer* 97-106 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002). Estas técnicas, sin embargo, están cada una limitadas por una diversidad de factores: TUS está impedida por el gas en tracto gastrointestinal y la grasa en el peritoneo, EUS requiere experiencia considerable en ultrasonografía y endoscopia y puede no estar ampliamente disponible, e IUS puede solamente usarse intraoperatoriamente, Kaur y col., *supra* en 86.

Aunque en sus fases nacientes, la investigación sobre marcadores que ayuden en la estadificación del cáncer pancreático ha hallado algunas posibles ventajas. Por ejemplo, las investigaciones han revelado que dos genes supresores de metástasis, *nm23-H1* y *KAI1*, se expresan diferencialmente dependiendo de la fase del cáncer pancreático, estando su expresión regulada positivamente en fases tempranas y regulada negativamente en fases posteriores de la enfermedad. Friess, H. y col., *J. Clin. Oncol.* 19(9): 2422-32 (2001). Los investigadores también se han centrado en la estadificación de los ganglios linfáticos genéticos, particularmente buscando mutaciones en el proto-oncogén K-ras. Yamada, T. y col., *Int'l J. Oncol.* 16(6): 1165-71 (2000). Así mismo, las investigaciones han identificado que la presencia de secuencias K-ras mutadas en plasma/suero está asociada con cáncer pancreático en fase tardía, aunque la presencia de cáncer pancreático en fase temprana podía detectarse también de este modo. Sorenson, G.D., *Clin. Cancer Res.* 6(6): 2129-37 (2000). Una técnica de estadificación prometedora usando un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa de multimarcadores ha distinguido satisfactoriamente fases de cáncer pancreático ensayando muestras sanguíneas y tisulares para la expresión de ARNm de los siguientes marcadores tumorales: el gen de la gonadotropina coriónica β humana, el gen *c-met* del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, y el gen de la β -1,4-N-acetil-galactosaminil-transferasa. Bilchik, A. y col., *Cancer* 88(5): 1037-44 (2000).

Un sistema de clasificación habitualmente para estadificar el cáncer pancreático es el sistema TNM ideado por la Union Internationale Contre le Cancer. *AJCC Cancer Staging Handbook* 3 (Irvin D. Fleming y co. eds., 5ª ed. 1998). Este sistema está dividido en varias fase

s, cada una de las cuales evalúa el grado de crecimiento canceroso con respecto al tumor primario (T), ganglios linfáticos regionales (N), y metástasis distante (M). *Id.*

La fase 0 se caracteriza por carcinoma *in situ* (Tis), sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales (N0) y sin metástasis distante (M0). *Id.* en 113. Las fases I y II difieren de la fase 0 solamente en términos de categoría tumoral: la fase I implica un tumor limitado solamente al páncreas que es (1) 2 cm o menor en su dimensión mayor (T1) o (2) mayor de 2 cm en su mayor dimensión (T2), mientras que la fase II implica un tumor que se extiende directamente en el duodeno, conducto biliar, o tejidos peripancreáticos (T3). *Id.* La fase III implica la categoría tumoral T1, T2, o T3; metástasis de ganglios linfáticos regionales (N1), que implica un único ganglio linfático (pN1a) o múltiples ganglios linfáticos (pN1b); y sin metástasis distante (M0). La fase IVA se caracteriza por extensión tumoral directamente en el estómago, bazo, colon, o vasos grandes adyacentes (T4); cualquier categoría N; y sin metástasis distante (M0). Finalmente, la fase IVB se caracteriza por cualquier categoría T, cualquier categoría N, y metástasis distante (M1). *Id.*

Una vez se ha estadificado el cáncer, el único tratamiento consistentemente eficaz para la enfermedad es cirugía, y siendo solamente un 10 a un 15 % de los pacientes capaces de experimentar recesión potencialmente curativa. Jean y col., *supra* en 15; Fleming y col. eds., *supra* en 111; William F. Regine, Postoperative Adjuvant Therapy: Past, Present, and Future Trial Development, en *Pancreatic Cancer* 235 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002). Además, la supervivencia de cinco años de aquellos pacientes que experimentan recesión está por debajo del veinte por ciento. Regine, *supra* en 235. Aunque agentes quimioterapéuticos tales como gemcitabina y 5-fluorouracilo han mostrado alguna eficacia contra carcinomas pancreáticos, la realidad es que la quimioterapia ha mostrado poco impacto sobre la supervivencia de cáncer pancreático. Burdette, *supra* en 101. La radioterapia ha proporcionado resultados conflictivos con respecto a su eficacia, id., aunque la radiación en combinación con 5-fluorouracilo se ha mostrado algo prometedora, Regine, *supra* en 235.

En vista de los fallos de las técnicas convencionales en el tratamiento del cáncer pancreático, se han investigado varios nuevos enfoques que emplean las técnicas de biología molecular. Se han realizado investigaciones considerables en el área de terapia génica, incluyendo tecnología antisentido, estrategias de activación de profármacos dirigidas por genes, estrategias de genes promotores, y terapias virales oncolíticas. Eugene A. Choi y Francis R. Spitz, *Strategies for Gene Therapy*, en *Pancreatic Cancer* 331 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002); Kasuya, H. y col., *Hepatology* 48(40): 957-61 (2001). Otros enfoques recientes se han centrado en la inhibición de las metaloproteinasas de matriz, enzimas que facilitan la metástasis e invasión de las células tumorales a través de la degradación de las membranas basales, y su papel en la degradación estromática peritumoral y la angiogénesis. Alexander S. Rosemurgy, II y Mahmudul Haq, *Role of Matrix Metalloproteinase Inhibition in the Treatment of Pancreatic Cancer*, en *Pancreatic Cancer* 369 (Douglas B. Evans y col. eds., 2002).

Angiogénesis en cáncer

El crecimiento y la metástasis de los tumores sólidos también dependen del angiogénesis. Folkman, J., 1989, *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 4-6. Se ha demostrado, por ejemplo, que tumores que se agrandan a más de 2 mm deben obtener su propio suministro sanguíneo y hacerlo induciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares. Una vez que estos nuevos vasos sanguíneos han llegado a incluirse en el tumor, proporcionan un medio a las células tumorales de entrar en la circulación y metastatizar a sitios distantes tales como el hígado, el pulmón o los huesos. Weidner, N., y col., 1991, *The New England Journal of Medicine*, 324(1), 1-8.

La angiogénesis, definida como el crecimiento o brote de nuevos vasos sanguíneos desde vasos existentes, es un proceso complejo que sucede principalmente durante el desarrollo embrionario. El proceso es distinto de la vasculogénesis, ya que las nuevas células endoteliales que revisten los vasos surgen de la proliferación de células existentes, en lugar de diferenciarse desde células madre. El proceso es invasivo y dependiente de la proteólisis de la matriz extracelular (ECM), la migración de nuevas células endoteliales, y la síntesis de nuevos componentes de matriz. La angiogénesis sucede durante el desarrollo embriológico del sistema circulatorio; sin embargo en seres humanos adultos, la angiogénesis solamente sucede como respuesta a una afección patológica (excepto durante el ciclo reproductor en mujeres).

En condiciones fisiológicas normales en adultos, la angiogénesis tiene lugar solamente en situaciones muy restringidas tales como el crecimiento capilar y curación de heridas. Auerbach, W. y Auerbach, R., 1994, *Pharmacol Ther.* 63(3):265-3 11; Ribatti y col., 1991, *Haematologica* 76(4):3 11-20; Risau, 1997, *Nature* 386(6626):67 1-4. La angiogénesis progresa por un estímulo que provoca la formación de una columna migradora de células endoteliales. La actividad proteolítica está centrada en la punta de avance de este "brote vascular", que descompone la ECM suficientemente para permitir que la columna de células se infiltre y migre. Tras el frente de avance, las células endoteliales se diferencian y comienzan a adherirse entre sí, formando de este modo una nueva membrana basal. Las células entonces cesan de proliferar y finalmente definen una luz para la nueva arteriola o capilar.

La angiogénesis no regulada ha sido reconocida gradualmente como responsable de una amplia gama de trastornos, incluyendo, aunque sin limitación, cáncer, enfermedad cardiovascular, artritis reumatoide, psoriasis y retinopatía diabética. Folkman, 1995, *Nat Med* 1(1):27-31; Isner, 1999, *Circulation* 99(13): 1653-5; Koch, 1998, *Arthritis Rheum* 41(6):951-62; Walsh, 1999, *Rheumatology (Oxford)* 38(2):103-12; Ware y Simons, 1997, *Nat Med* 3(2): 158-64.

Es de particular interés la observación de que la angiogénesis es necesaria para que los tumores sólidos crezcan y metastaticen. Folkman, 1986 *supra*; Folkman 1990, *J Natl. Cancer Inst.*, 82(1) 4-6; Folkman, 1992, *Semin Cancer Biol* 3(2):65-71; Zetter, 1998, *Annu Rev Med* 49:407-24. Un tumor habitualmente comienza en una única célula aberrante que puede proliferar solamente a un tamaño de unos pocos milímetros cúbicos debido a la distancia desde los lechos capilares disponibles, y puede permanecer 'durmiente' sin crecimiento adicional y diseminación durante un largo periodo de tiempo. Algunas células tumorales después cambian al fenotipo angiogénico para activar las células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos recién formados no solamente permiten un crecimiento continuado del tumor primario, sino también la diseminación y recolonización de células tumorales metastásicas. Los mecanismos precisos que controlan el cambio angiogénico no están bien comprendidos, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral es el resultado del equilibrio neto de una multitud de estimuladores e inhibidores de la angiogénesis Folkman, 1995, *supra*.

Uno de los inhibidores de angiogénesis más potentes es la endostatina identificada por O'Reilly y col., 1997, Cell 88(2):277-85; O'Reilly y col., 1994, Cell 79(2):3 15-28. Su descubrimiento se basó en el fenómeno de que ciertos tumores primarios pueden inhibir el crecimiento de metástasis distantes. O'Reilly y Folkman hipotetizaron que un tumor primario inicia la angiogénesis generando estimuladores angiogénicos en exceso de los inhibidores. Sin embargo, los inhibidores angiogénicos, en virtud de su semivida más larga en la circulación, alcanzan el sitio de un tumor secundario en exceso de los estimuladores. El resultado neto es el crecimiento del tumor primario y la inhibición del tumor secundario. La endostatina es uno de una lista creciente de dichos inhibidores de la angiogénesis producido por los tumores primarios. Es un fragmento proteolítico de una proteína más grande: la endostatina es un fragmento de 20 kDa del colágeno XVIII (aminoácido H1132-K1315 en el colágeno XVIII murino). Se ha demostrado que la endostatina inhibe específicamente la proliferación de células endoteliales in vitro y bloquea la angiogénesis in vivo. De forma más importante, la administración de endostatina a ratones que albergan tumores conduce a una regresión significativa del tumor, y no se ha observado toxicidad o resistencia a fármacos incluso después de múltiples ciclos de tratamiento. Boehm y col., 1997, Nature 390(6658):404-407. El hecho de que la endostatina se dirija a células endoteliales genéticamente estables e inhiba una diversidad de tumores sólidos lo hace un candidato muy atractivo para terapia antineoplásica. Fidler y Ellis, 1994, Cell 79(2):185-8; Gastl y col., 1997, Oncology 54(3):177-84; Hinsbergh y col., 1999, Ann Oncol 10 Suppl 4:60-3. Además, se ha demostrado que los inhibidores de la angiogénesis son más eficaces cuando se combinan con radiación y agentes quimioterapéuticos. Klement, 2000, J. Clin Invest, 105(8) R15-24. Browder, 2000, Cancer Res. 6-(7) 1878-86, Arap y col., 1998, Science 279(5349):377-80; Mauceri y col., 1998, Nature 394(6690):287-91.

Como se ha analizado anteriormente, cada uno de los procedimientos para diagnosticar y estadificar cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama está limitado por la tecnología empleada. Por consiguiente, existe la necesidad de marcadores moleculares y celulares sensibles para la detección de cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama. Existe la necesidad de marcadores moleculares para la estadificación precisa, incluyendo la estadificación clínica y patológica, de cánceres de ovario, pancreático, pulmonar o de mama para optimizar los procedimientos de tratamiento. Además, existe la necesidad de marcadores moleculares y celulares sensibles para controlar el progreso de los tratamientos contra el cáncer, incluyendo marcadores que puedan detectar la recurrencia de cánceres de ovario, pancreático, pulmonar o de mama después de la remisión.

La presente invención proporciona procedimientos alternativos para tratar cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama que superan las limitaciones de los procedimientos terapéuticos convencionales así como ofrecer ventajas adicionales que serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Enfermedad autoinmune

La actividad celular del sistema inmune está controlada por una red compleja de interacciones de superficie celular y procesos de señalización asociados. Cuando un receptor de superficie celular es activado por su ligando, se envía una señal a la célula y, dependiendo de la vía de transducción de señales que esté comprometida, la señal puede ser inhibidora o activadora. Para muchos sistemas receptores la actividad celular está regulada por un equilibrio entre señales activadoras y señales inhibidoras. En algunos de estos se sabe que las señales positivas asociadas con el acoplamiento de un receptor de superficie celular por su ligando están moduladas negativamente o inhibidas por señales negativas enviadas por el acoplamiento de un receptor de superficie celular diferente por su ligando.

Los mecanismos bioquímicos de estas vías de señalización positivas y negativas se han estudiado para varias interacciones reconocidas entre el receptor y el ligando del sistema inmune. Muchos receptores que median la señalización positiva tienen colas citoplasmáticas que contienen sitios de fosforilación por tirosina fosfatasa conocidos como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptor (ITAM). Una vía mecanística común para la señalización positiva implica la activación de tirosina quinasas que fosforilan sitios en los dominios citoplasmáticos de los receptores y en otras moléculas de señalización. Una vez que se han fosforilado los receptores, se crean sitios de unión para moléculas de transducción de señales que inician las vías de señalización y activan la célula. Las vías inhibidoras implican receptores que tienen motivos inhibidores basados en tirosina de inmunorreceptor (ITIM) que, como los ITAM, se fosforilan por tirosina quinasas. Los receptores que tienen estos motivos están implicados en señalización inhibidora porque estos motivos proporcionan sitios de unión para tirosina fosfatasas que bloquean la señalización eliminando la tirosina de los receptores activados o las moléculas de transducción de señales. Aunque muchos de los detalles de los mecanismos de activación e inhibidores son desconocidos, está claro que el equilibrio funcional en el sistema inmune depende de las señales activadoras e inhibidoras opuestas.

Un ejemplo de actividad del sistema inmune que está regulado por un equilibrio de señalización positiva y negativa es la proliferación de células B. El receptor de antígenos de células B es una inmunoglobulina de superficie de células B que, cuando se une al antígeno, media una señal positiva que conduce a la proliferación de células B. Sin embargo, las células B también expresan Fc.gamma. RIIb1, un receptor de IgG de baja afinidad. Cuando un antígeno es parte de un complejo inmune con inmunoglobulina soluble, el complejo inmune puede unirse a células B por acoplamiento tanto del receptor del antígeno de células B mediante el antígeno como por Fc.gamma. RIIb1 mediante la inmunoglobulina soluble. El co-acoplamiento del Fc.gamma. RIIb1 con el complejo receptor de células B modula negativamente la señal de activación y evita la proliferación de células B. Los receptores Fc.gamma. RIIb1 contienen motivos ITIM que se cree que suministran señales inhibidoras a las células B mediante la interacción de

los ITIM con tirosina fosfatasas tras el co-acoplamiento con receptores de células B.

La actividad citolítica de las células Natural Killer (NK) es otro ejemplo de actividad del sistema inmune que está regulado por un equilibrio entre señales positivas que inician la función celular y señales inhibitoras que evitan la actividad. Los receptores que activan la actividad citolítica NK no están completamente comprendidos. Sin embargo, si las células diana expresan antígenos MHC de clase I de superficie celular para los cuales la célula NK tiene un receptor específico, la célula diana se protege de la eliminación por NK. Estos receptores específicos, conocidos como Receptores Inhibidores de Killer (KIR) envían una señal negativa cuando se acoplan por su ligando MHC, regulando negativamente la actividad citolítica de la célula NK.

Los KIR pertenecen a la súper familia de inmunoglobulinas o la familia de lectina tipo C (véase Lanier y col., *Immunology Today* 17:86-91,1996). Los KIR de NK humanas conocidos son miembros de la súper familia de inmunoglobulinas y presentan diferencias y similitudes en sus regiones extracelulares, transmembrana y citoplasmáticas. Una secuencia de aminoácidos del dominio citoplasmático común para muchos de los KIR es un motivo ITIM que tiene la secuencia YxxL/V. En algunos casos, se ha demostrado que los ITIM fosforilados reclutan tirosina fosfatasas que desfosforilan moléculas en la vía de transducción de señales y evitan la activación celular (véase Burshtyn y col., *Immunity* 4:77-85, 1996). Los KIR habitualmente tienen dos de estos motivos espaciados por 26 aminoácidos [YxxL/V(x).sub.26YxxL/V]. Al menos dos receptores de células NK, cada uno específico para un alelo C de antígeno leucocitario humano (HLA) (una molécula MHC de clase I), existen como receptor inhibitor y activador. Estos receptores son altamente homólogos en las partes extracelulares, pero tienen diferencias mayoritarias en sus partes transmembrana y citoplasmática. Una de las diferencias es la aparición del motivo ITIM en el receptor inhibitor y la ausencia del motivo ITIM en el receptor activador (véase Biassoni y col., *Journal. Exp. Med.*, 183:645-650, 1996).

Un inmunorreceptor expresado por mastocitos de ratón, gp49B1, también un miembro de la súper familia de inmunoglobulinas, es conocido por regular negativamente las señales de activación celular y contiene un par de motivos ITIM. Gp49B1 comparte un alto grado de homología con los KIR humanos (Katz y col., *Cell Biology*, 93: 10809-10814, 1996). Las células NK de ratón también expresan una familia de inmunorreceptores, la familia Ly49, que contiene el motivo ITIM y funciona de un modo similar a los KIR humanos. Sin embargo, los inmunorreceptores Ly49 no tienen homología estructural con los KIR humano y contienen un dominio extracelular de lectina tipo C, haciéndolos un miembro de la súper familia de moléculas de lectina (véase Lanier y col., *Immunology Today* 17:86-91, 1996).

Claramente, las señales activadoras e inhibitoras del sistema inmune mediadas por quinasas y fosfatasas opuestas son muy importantes para mantener el equilibrio en el sistema inmune. Los sistemas con una predominancia de señales activadoras conducirán a autoinmunidad e inflamación. Los sistemas inmunes con una predominancia de señales inhibitoras son menos capaces de retar a células infectadas o células cancerosas. El aislamiento de nuevos receptores activadores o inhibidores es muy deseable para estudiar la señal o señales biológicas transducidas mediante el receptor. Adicionalmente, la identificación de dichas moléculas proporciona un medio para regular y tratar patologías asociadas con autoinmunidad, inflamación e infección.

Los epítopes de anticuerpo codificados por el polinucleótido 08E de carcinoma de ovario y reconocido por el antisuero policlonal 08E se describen en el documento WO 02/06317.

Shroyer y col., Characterization of Ovr110 Expression, A Novel Type II Membrane Protein, in serous, endometrioid, and clear cell ovarian carcinoma, *Analytical Cellular Pathology* 2003, vol. 25, n°. 5-6, página 297, demostraron que Ovr110 es una nueva proteína de membrana integral tipo II que se identificó por extracción de bases de datos genómicas como un EST/gen que muestra regulación positiva en células cancerosas de ovario.

En el documento WO 2004/101756, se describieron anticuerpos contra Ovr110 aislados que se unen a Ovr110 en una célula de mamífero in vivo, que difiere de los anticuerpos de la presente invención.

Por ejemplo, el acoplamiento de un ligando tal como Ovr110 que interacciona con un receptor de superficie celular que tiene motivos ITIM con un anticuerpo antagonista o receptor soluble puede usarse para activar la función inmune específica en patologías asociadas con función inmune suprimida. Por otro lado, usando un anticuerpo antagonista específico para Ovr110 o puede usarse una forma soluble del receptor de Ovr110 para bloquear la interacción de Ovr110 con el receptor de superficie celular para reducir la función inmune específica en patologías asociadas con función inmune aumentada. A la inversa, como receptores que carecen del motivo ITIM envían señales activadoras una vez se han acoplado como se ha descrito anteriormente, el efecto de anticuerpos y receptores solubles es el opuesto al que se acaba de describir.

Como se ha analizado anteriormente, los procedimientos para diagnosticar y estadificar la enfermedad autoinmune están limitados por la tecnología empleada. Por consiguiente, existe la necesidad de marcadores moleculares y celulares sensibles para la detección de enfermedades autoinmunes. Existe la necesidad de marcadores moleculares para la estadificación precisa, incluyendo la estadificación clínica y patológica, de enfermedades autoinmunes para optimizar los procedimientos de tratamiento. Además, existe la necesidad de marcadores moleculares y celulares sensibles para controlar el progreso de los tratamientos para las enfermedades

autoinmunes, incluyendo marcadores que puedan detectar la recurrencia de enfermedades autoinmunes después de su remisión.

La presente invención proporciona procedimientos alternativos para tratar enfermedades autoinmunes que superan las limitaciones de los procedimientos terapéuticos convencionales así como ofrecer ventajas adicionales que serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo contra Ovr110 aislado que se une a Ovr110 en una célula de mamífero in vivo. La invención se refiere adicionalmente a un anticuerpo contra Ovr110 aislado que 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 puede producirse por un hibridoma seleccionado entre el grupo de hibridomas depositados en la American Type Culture Collection con el número de acceso PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856, PTA-5884, PTA-6266, PTA-7128 y PTA-7129.

El anticuerpo de la invención puede competir por la unión al mismo epítipo que el epítipo unido por el anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo de hibridomas depositados en la American Type Culture Collection con los números de acceso PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856, PTA-5884, PTA-6266, PTA-7128 y PTA-7129.

La invención también se refiere a anticuerpos conjugados. Pueden conjugarse 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, aunque sin limitación, maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina o caliqueamicina.

La célula de mamífero puede ser una célula cancerosa. Preferentemente, el anticuerpo monoclonal anti-Ovr110 inhibe el crecimiento de células cancerosas que expresan Ovr110 in vivo.

El anticuerpo puede producirse 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 a la ATCC PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856, PTA-5884, PTA-6266, PTA-7128 y PTA-7129.

Preferentemente, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de ovario, pancreático, pulmonar y de mama. La invención también se refiere a un procedimiento para producir los anticuerpos que comprende cultivar una célula apropiada y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

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

La invención también se refiere a un procedimiento in vitro para eliminar una célula cancerosa que expresa Ovr110, que comprende poner en contacto la célula cancerosa con los anticuerpos de la presente invención, eliminando de este modo la célula cancerosa. La célula cancerosa puede seleccionarse entre el grupo que consiste en célula cancerosa de ovario, pancreática, pulmonar y de mama.

El cáncer de ovario, o de mama puede ser adenocarcinoma seroso de ovario o carcinoma ductal infiltrante de mama o cáncer metastásico. El cáncer de mama puede ser cáncer de mama HER-2 negativo. La invención también se refiere a una composición para su uso en el alivio de un cáncer que expresa Ovr110 en un mamífero, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos al mamífero.

Además, la invención se refiere a un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento. El artículo de fabricación también puede comprender un componente adicional, por ejemplo, un prospecto que indique que la composición puede usarse para tratar cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama.

Además, los trastornos mediados por enfermedad autoinmune asociada con fallo en la señalización negativa por receptores que se unen a Ovr110 para regular negativamente la función celular pueden tratarse administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una forma soluble de Ovr110 a un paciente afectado con dicho trastorno. Los trastornos mediados por patologías asociadas con función inmune suprimida pueden tratarse administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de Ovr110. A la inversa, trastornos mediados por enfermedades asociadas con un fallo en la señalización activadora por Ovr110 pueden tratarse administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una forma soluble de Ovr110. Los trastornos mediados por patologías asociadas con la función autoinmune pueden tratarse administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de Ovr110. Dichos trastornos autoinmune incluyen, aunque sin limitación: esclerosis múltiple, miastenia grave, neuropatías autoinmunes tales como Guillain-Barré, uveítis autoinmune, enfermedad de Crohn,

colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, trombocitopenia autoinmune, arteritis temporal, síndrome anti-fosfolípido, vasculitis tales como granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behcet, psoriasis, dermatitis herpetiforme, pénfigo vulgar, vitiligo, diabetes mellitus de tipo 1 o mediada por el sistema inmune, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, ooforitis y orquitis autoinmune, enfermedad autoinmune de la glándula suprarrenal, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, esclerodermia, polimiositis, dermatomiositis, espondiloartropatías tales como espondilitis anquilosante y síndrome de Sjogren.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 muestra los resultados de análisis FACS de células LMTK de ratón transfectadas con Ovr110.
 La FIGURA 2 muestra la inmunofluorescencia con Ovr110-A57.1 en células cancerosas vivas de ovario y de mama.
 La FIGURA 3 muestra la unión e internalización de Ovr110-A57.1 en células cancerosas vivas de ovario y de mama.
 La FIGURA 4 muestra la inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma seroso de ovario.
 La FIGURA 5 muestra la inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma ductal infiltrante de mama.
 La FIGURA 6 muestra la inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma pancreático.
 La FIGURA 7: A-F muestra la expresión de miembros de la familia B7 el día 3 en células T estimuladas con PHA abiertas en CD3 por FITC y; G-I muestra la unión de la proteína de fusión BTLA-Fc a células Ovr110-293F.
 La FIGURA 8 A-C muestra la detección por transferencia de Western de la proteína Ovr110 con mAb A57.1 en líneas celulares y tejidos tumorales humanos.
 La FIGURA 9 muestra que la proteína Ovr110 no se detecta en extractos de órganos principales.
 La FIGURA 10 muestra el silenciamiento específico del ARNm de Ovr110 en células cancerosas de mama SKBR3.
 La FIGURA 11 muestra la regulación negativa de la proteína Ovr110 por ARNip en células SKBR3.
 La FIGURA 12 muestra que el silenciamiento del ARNm de Ovr110 induce la apoptosis en células SKBR3.
 La FIGURA 13 muestra que el silenciamiento del ARNm de Ovr110 induce la actividad caspasa en células SKBR3.
 La FIGURA 14 muestra que la sobre-expresión de Ovr110 potencia el crecimiento de xenoinjerto tumoral.
 La FIGURA 15 muestra que la sobre-expresión de Ovr110 protege de la apoptosis.
 La FIGURA 16 muestra el mapa de epítopes 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 la detección de Ovr110 en diferentes tipos de cáncer de ovario y muestras de enfermedad benigna.
 La FIGURA 19 muestra las curvas de Característica Operativa del Receptor (ROC) para detectar Ovr110.
 La FIGURA 20 muestra los dominios de la proteína Ovr110 y las regiones de unión a anticuerpo incluyendo el péptido señal, los dominios IgV, IgC y transmembrana, y la región usada para construir péptidos solapantes.
 La FIGURA 21 muestra una alineación de la proteína Ovr110 y el miembro de la familia humana.
 La FIGURA 22 muestra una alineación de la proteína Ovr110 y homólogos.
 La FIGURA 23 muestra las interacciones ligando-receptor entre células T y APC.
 La FIGURA 24 muestra un esquema de experimentos funcionales de proliferación de células T 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 glucoproteína, cuya secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos son como se desvelan 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 de ovario humano; el documento WO 02/02624-A2 proteína similar a B7 humana (B7-L); el documento WO 2004/101756, Ovr110. 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 Ovr110.

Ovr110 es conocida en la bibliografía como B7x, B7H4, B7S1, B7-H4 o B7h.5. La base de datos RefSeq en el NCBI indica el acceso NM_024626 como "dominio de serie V de Homo sapiens que contiene ARNm del inhibidor de activación 1 de células T (VTCN1)". Este nucleótido y la proteína codificada NP_078902.1 han proporcionado el siguiente resumen:

B7H4 pertenece a la familia B7 (véase CD80; MIM 112203) de proteínas coestimuladoras. Estas proteínas se expresan sobre la superficie de células presentadoras de antígeno e interactúan con ligandos (por ejemplo, CD28; MIM 186760) en linfocitos T. [suministro por OMIM].

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 Ovr110 identificada previamente y la secuencia pronosticada de las moléculas B7-H4/B7x humanas (Sica 2003; Zang 2003) eran idénticas a Ovr110. El análisis inmunofluorescente indirecto por citometría de flujo confirmó adicionalmente la unión de los anticuerpos monoclonales contra Ovr110 a poblaciones de linfocitos T activados, como se ha descrito por estos autores. A continuación se enumera una lista de referencias que analizan Ovr110.

Tringler B, Liu W, Corral L, Torkko KC, Enomoto T, Davidson S, Lucia MS, Heinz DE, Papkoff J, Shroyer KR. B7-H4 overexpression in ovarian tumors. <i>Gynecol Oncol.</i> 2005 Oct. 24; [Epub antes de su publicación impresa]
Ichikawa M, Chen L. Role of B7-H1 and B7-H4 molecules in down-regulating effector phase of T-cell immunity: novel cancer escaping mechanisms. <i>Front Biosci.</i> 2005 Sep 1;10:2856-60
Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. <i>Genome Biol.</i> 2005;6(6):223. Epub 2005 May. 31.
Salceda S, Tang T, Kmet M, Munteanu A, Ghosh M, Macina R, Liu W, Pilkington G, Papkoff J. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation. <i>Exp Cell Res.</i> 2005 May. 15;306(1):128-41.
Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. <i>Annu Rev Immunol.</i> 2005;23:515-48. Revisión.
Tringler B, Zhuo S, Pilkington G, Torkko KC, Singh M, Lucia MS, Heinz DE, Papkoff J, Shroyer KR. B7-h4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer. <i>Clin Cancer Res.</i> 2005 Mar. 1;11(5): 1842-8.
Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, Hurchla MA, Lindsley RC, Hildner K, Scheu S, Pfeffer K, Ware CF, Murphy TL, Murphy KM. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. <i>Nat Immunol.</i> 2005 Ene.;6(1):90-8. Epub 2004 Nov. 28.
Loke P, Allison JP. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. <i>Arthritis Res Ther.</i> 2004;6(5):208-14. Epub 2004 Ago. 5. Revisión.
Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. <i>Microbes Infect.</i> 2004 Jul.;6(8):759-66. Revisión.
Choi IH, Zhu G, Sica GL, Strome SE, Cheville JC, Lau JS, Zhu Y, Flies DB, Tamada K, Chen L. Genomic organization and expression analysis of B7-H4, an immune. inhibitory molecule of the B7 family. <i>J Immunol.</i> 2003 Nov. 1;171(9): 4650-4.
Carreno BM, Collins M. BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand. <i>Trends Immunol.</i> 2003 Oct.;24(10): 524-7. Revisión.
Prasad DV, Richards S, Mai XM, Dong C. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. <i>Immunity.</i> 2003 Jun.; 18(6): 863-73.
Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, Chapoval AI, Flies DB, Bajorath J, Chen L. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. <i>Immunity.</i> 2003 Jun.;18(6):849-61.
Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, Yang J, Fallarino F, Loftin SK, Hurchla MA, Zimmerman N, Sim J, Zang X, Murphy TL, Russell JH, Allison JP, Murphy KM. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. <i>Nat Immunol.</i> 2003 Jul.;4(7):670-9. Epub 2003 Jun. 8

Los hallazgos de los inventores con respecto a que Ovr110 está limitado aparentemente a los cánceres de ovario y de mama 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 "anticuerpo" (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 proteicos o no proteicos. Preferentemente, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo determinado por el procedimiento de Lowry y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la 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 glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H) (un anticuerpo IgM consta de 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 disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más puentes disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tienen puentes 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 [L y F. 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 (CH1).

Se cree que los restos aminoacídicos 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 (CHO), 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 minoritarias 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 constan de tramos relativamente invariables denominados regiones flanqueantes (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas cada uno comprende cuatro FR, adoptando en su mayoría una configuración de lámina P, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan con 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 FR 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 anticuerpos (ADCC).

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos aminoacídicos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos aminoacídicos 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 minoritarias. 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 (epítopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige a un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en el sentido de que pueden sintetizarse 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 por primera vez por Kohler y col., Nature, 256-495 (1975), o pueden prepararse usando procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas animales o vegetales (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos 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 dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (véase la patente de 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 "privatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable obtenidas a partir de un primate no humano (por ejemplo, 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 Estados Unidos N° 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata y col., Proteon Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas monocatenarias de anticuerpo; y anticuerpos multispecíficos 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 consta de 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, 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 entrecruzar antígenos. 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 del 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 ellos. 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 consta de 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 los restos aminoácidos 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 monocatenario" también abreviado como "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 enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que posibilita que sFv forme la estructura deseada para su unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

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 un 70 % de homología con la secuencia nativa Ovr110, preferentemente, al menos aproximadamente un 80 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de homología y mucho más preferentemente al menos un 95 %. Las variantes de secuencia de aminoácidos pueden poseer sustituciones, deleciones 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 tal modo que se evite o reduzca sustancialmente la capacidad de dicha 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 puede medirse 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).
- Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen la 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 remplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, los restos de la región flanqueante (FR) de la inmunoglobulina humana se remplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo o al menos uno y normalmente 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 FR son de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente 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).
- Como se usa en el presente documento, un anticuerpo anti-Ovr110 que "se internalizar" 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 eliminar una célula que expresa Ovr110, especialmente una célula cancerosa que expresa Ovr110. Dependiendo de la potencia del anticuerpo o conjugado de anticuerpo, en algunos casos, la captación de una molécula de anticuerpo única en la célula es suficiente para eliminar la célula diana a la que se une el anticuerpo. Por ejemplo, determinadas toxinas son altamente potentes en la eliminación, de modo que la internalización de una molécula de la toxina conjugada al anticuerpo es suficiente para eliminar la célula tumoral.
- 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 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 contra otro antígeno en las células de interés, sabiéndose que dicho anticuerpo se internaliza tras la unión al antígeno. El anticuerpo se puede administrar al animal, por ejemplo, por inyección intravenosa. En intervalos de tiempo adecuados, se pueden preparar secciones tisulares del animal usando procedimientos conocidos o como se describe en los ejemplos experimentales más adelante y analizarse por microscopía óptica o microscopía electrónica, para determinar la internalización así como también la localización del anticuerpo internalizado en la célula. Para internalización in vitro, las células se pueden incubar en placas de cultivo tisular 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 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 trituran y la cantidad de recuentos resistentes a proteasa radiactivos por minuto (cpm) asociados con cada lote de células se mide haciendo pasar el homogeneizado 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 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 bien el anticuerpo 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, 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 eliminación deseada o el efecto inhibidor 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 estos favorecen la eliminación 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, en 24 horas desde la administración del anticuerpo in vivo, más preferentemente en aproximadamente 12 horas, aún más preferentemente en aproximadamente 30 minutos a 1 hora y mucho más preferentemente en aproximadamente 30 minutos. La presente invención proporciona anticuerpos que se internalizan tan rápido como aproximadamente 15 minutos desde el momento de introducción del anticuerpo anti-Ovr110 in vivo. El anticuerpo preferentemente se internalizará en la célula en unas pocas horas tras la unión a Ovr110 en la superficie celular, preferentemente en una hora, aún más preferentemente en 15-30 minutos.

Para determinar si un anticuerpo de ensayo puede competir por la unión al mismo epítipo que el epítipo unido por los anticuerpos anti-Ovr110 de la presente invención incluyendo los anticuerpos producidos por los hibridomas depositados en la ATCC, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado, por ejemplo, un ELISA competitivo. En un ensayo ELISA competitivo ilustrativo, se incuban pocillos recubiertos con Ovr110 de una placa de microtitulación o perlas de sepharose recubiertas con Ovr110, previamente con o sin anticuerpo competidor candidato y después se añade un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención marcado con biotina. La cantidad de anticuerpo anti-Ovr110 unido al antígeno Ovr110 en los pocillos o en las perlas se mide usando el conjugado avidina-peroxidasa y el 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 recubiertos con antígeno. Un anticuerpo competidor candidato se considera un anticuerpo que se une sustancialmente al mismo epítipo o que compete 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 (previamente identificado como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A99.1, 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, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2 y Ovr110.J3, es uno que posee una o más de las características biológicas de ese 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 (previamente identificado como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A99.1, 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, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2 y

Ovr110.J3 se unirán al mismo epítipo que el unido por Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A99.1, 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, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2 y Ovr110.J3 (por ejemplo, que compite por la unión o bloquea la unión del anticuerpo monoclonal Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado 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, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2. y Ovr110.J3 a Ovr110, es capaz de dirigirse a una célula tumoral que expresa Ovr110 in vivo y puede internalizarse tras la unión a Ovr110 en una célula de mamífero in vivo. Asimismo, un anticuerpo con la característica biológica del anticuerpo Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado 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, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2. y Ovr110.J3 a Ovr110, es capaz de dirigirse a una célula tumoral que expresa Ovr110 in vivo y puede internalizarse tras la unión a Ovr110 en una célula de mamífero in vivo. Asimismo, un anticuerpo con la característica biológica del anticuerpo Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado 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, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2 y Ovr110.J3 tendrá las mismas propiedades de unión a epítipo, direccionamiento, internalización, inhibidoras del crecimiento tumoral y citotóxicas del anticuerpo.

El término anticuerpo "antagonista" se usa en el sentido más amplio e incluye un anticuerpo que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de una proteína Ovr110 nativa desvelada 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.

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 provoca una inhibición del crecimiento medible de células cancerosas que expresan o sobre-expresan Ovr110. Los anticuerpos anti-Ovr110 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células tumorales que expresan Ovr110, por ejemplo, células cancerosas de ovario, pancreáticas, pulmonares o de mama, 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 normalmente células tumorales 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 tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de células tumorales in vivo puede determinarse 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 provoca la reducción del tamaño del tumor o de la proliferación de células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en aproximadamente 5 a 30 días.

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 endoplasmático, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos). La célula habitualmente es una que sobre-expresa Ovr110. Preferentemente la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de ovario, pancreática, pulmonar o de mama. Diversos procedimientos están disponibles para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la traslocación de fosfatidil serina (PS) mediante la unión de anexina; la fragmentación del ADN se puede evaluar a través de la formación de ADN en escalera y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación del ADN se puede evaluar mediante cualquier aumento en las células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que provoca de aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente de aproximadamente 5 a 50 veces y más preferentemente de aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión a anexina con relación a células no tratadas en un ensayo de unión a anexina.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo y varía con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

(ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B) y activación de células B.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida en receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células natural killer (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta antígeno y posteriormente elimine la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha eliminación. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan únicamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. 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 Estados Unidos N° 5.500.362 ó 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Natural Killer (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se desvela en Clynes y col. *PNAS (EE.UU.)* 95: 652-656 (1998).

"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. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y ajuste alternativas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmuno-receptora (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmuno-receptora (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 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)).

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 la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células natural killer (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.

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

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer pulmonar incluyendo cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma pulmonar y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer hepático, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, 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, cáncer cerebral, así como de cabeza y cuello y metástasis asociadas.

Una "célula que expresa Ovr110" es una célula que expresa Ovr110 endógeno o transfectado 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 celular. Un "cáncer que expresa Ovr110" produce niveles suficientes de Ovr110 en la superficie de las células del mismo, de modo 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 más elevados de Ovr110 en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobre-expresión puede estar causada por amplificación génica o por transcripción o traducción aumentada. La sobre-expresión 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, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; análisis FACS). Como alternativa

o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico o ARNm que codifica Ovr110 en la célula, por ejemplo, mediante 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), tales como PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobre-expresión de Ovr110 midiendo el antígeno en un fluido biológico tal como suero, por ejemplo, usando ensayos basados en anticuerpo (véase también, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.933.294 expedida el 12 de junio de 1990; el documento W091/05264 publicado el 18 de abril de 1991; la patente de 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 especialista en la técnica. 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 puede evaluar la unión del anticuerpo a las células del paciente, por ejemplo, mediante exploración externa para la radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente expuesto previamente al anticuerpo. Un cáncer que expresa Ovr110 incluye cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama. Los fluidos corporales incluyen todos los fluidos internos, secretados, expulsados y derivados del cuerpo tales como sangre, plasma, suero, orina, saliva, esputo, lágrimas, fluido ascítico, fluido de lavado peritoneal, fluido linfático, bilis, semen, pus, fluid amniótico, humor acuoso, cerumen, quilo, quimo, fluido intersticial, menstruación, leche, moco, fluido pleural, sudor, lubricación vaginal, vómito, fluid cefalorraquídeo y fluido sinovial.

Un "mamífero", para propósitos 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 el trastorno patológicos al que se dirige. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos propensos a 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 cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización hasta algún grado y preferentemente detención) de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo la propagación del cáncer en tejido blando y hueso; inhibición (alentización en algún grado y preferentemente detención) 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 cuestiones de calidad de vida. En la medida en que el anticuerpo anti-Ovr110 puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas 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 rutinarios familiares para el médico. Para terapia contra el cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando el índice de respuesta (RR).

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo o un fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un sujeto o en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir ralentizar hasta algún grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas 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". En la medida en que el que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico.

Administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes en un modo continuo frente a un modo agudo, para 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 estabilizadores 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 de pH tamponado. Los ejemplos de

vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (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, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita 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 la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas 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 antineoplásicos desvelados más adelante. Más adelante se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumorigénico 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 cancerosa 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, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también 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 e 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 antineoplásicos ambos obtenidos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), obtenido del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo cual provoca la inhibición de la mitosis en las células.

"Marcador" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo para 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 marcado" usada en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de anticuerpo anti-Ovr110 fusionado a un "polipéptido marca". El polipéptido marca tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo frente al cual se puede preparar un anticuerpo, aunque es lo suficientemente corto para que no interfiera con la actividad del polipéptido de Ig al cual está fusionado. El polipéptido marca también es preferentemente bastante singular para que el anticuerpo no reaccione de forma cruzada sustancialmente con otros epítopos. Los polipéptidos marca adecuados generalmente tienen al menos seis restos aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos aminoácidos).

Una "molécula pequeña" se define en el presente documento teniendo 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 dichos productos terapéuticos.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" es una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, ADN o un polímero mixto, que está sustancialmente separado de otras secuencias de ADN genómico así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan de forma natural 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 fagómico.

Normalmente, una construcción plasmídica también incluirá un origen de replicación (por ejemplo, el origen de replicación ColE1) y un marcador de selección (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 procariotas, por ejemplo, bacterianas o eucariotas. Los vectores adecuados se desvelan más adelante.

La célula que produce un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención incluirá la célula de hibridoma precursora, 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 proceso de silenciamiento génico post-transcripcional específico de secuencia en animales mediado por ARN de interferencia cortos (ARNip) (Fire y col., 1998, *Nature*, 391, 806). El proceso correspondiente en plantas comúnmente se denomina silenciamiento génico post-transcripcional o silenciamiento de ARN y también se denomina extinción en hongos. El proceso 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 foráneos que está comúnmente compartido por flora y filos diversos (Fire y col., 1999, *Trends Genet.*, 15, 358). Dicha protección de la expresión de genes foráneos puede haber evolucionado como respuesta a la producción de ARN bicatenarios (ARNbc) obtenidos de infección viral o la integración aleatoria de elementos de transposón en un genoma huésped mediante una respuesta celular que destruye específicamente ARN monocatenario homólogo o ARN genómico viral. La presencia de ARNbc en células desencadena la respuesta iARN a través de un mecanismo que aún no se ha caracterizado completamente. Este mecanismo parece ser diferente de la respuesta de interferón resultante de la activación mediada por ARNbc de la proteína quinasa PKR y la 2',5'-oligoadenilato sintetasa que provoca escisión no específica de ARNm por ribonucleasa L.

La presencia de ARNbc largos en células estimula la actividad de la enzima ribonucleasa III denominada dicer. Dicer está implicada en el procesamiento de los ARNbc en trozos cortos de ARNbc conocidos como ARN de interferencia cortos (ARNip) (Berstein y col., 2001, *Nature*, 409, 363). Los ARN de interferencia cortos obtenidos a partir de la actividad de dicer normalmente tienen 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 (ARNtp) a partir de ARN precursores de estructura conservada que están implicados en el control traduccional (Hutvagner y col., 2001, *Science*, 293, 834). La respuesta iARN también presenta un complejo de endonucleasa que contiene un ARNip, denominado comúnmente 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 ARNip. La escisión del ARN diana tiene lugar en el medio de la región complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNip (Elbashir y col., 2001, *Genes Dev.*, 15, 188).

La iARN mediada por ARN de interferencia corto 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 ARNbc en embriones de ratón. Hammond y col., 2000, *Nature*, 404, 293, describen iARN en células de *Drosophila* transfectadas con ARNbc. 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 longitud, estructura, composición química y secuencia del ARNip que son esenciales para mediar la actividad iARN eficaz. Estos estudios han demostrado que los dúplex de ARNip de 21 nucleótidos son más activos cuando contienen dos salientes nucleotídicos 3'. Además, la sustitución completa de una o ambas hebras de ARNip con 2'-desoxi(2'-H) o 2'-O-metil nucleótidos anula la actividad iARN, mientras que la sustitución de los salientes nucleotídicos de ARNip 3' terminales con desoxinucleótidos (2'-H) demostró ser tolerada. Secuencias desapareadas únicas en el centro del dúplex de ARNip también demostraron anular la actividad iARN. Además, 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 ARNip 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 hebra complementaria diana de un dúplex de ARNip para la actividad de ARNip y que se utiliza ATP para mantener el resto de fosfato 5' en el ARNip (Nykanen y col., 2001, *Cell*, 107, 309).

Estudios han demostrado que el remplazo de los segmentos salientes 3' de un dúplex de ARNip de 21 unidades que tiene 2 salientes nucleotídicos 3' con desoxirribonucleótidos no tiene un efecto adverso sobre la actividad iARN. Se ha informado de que el remplazo de hasta 4 nucleótidos en cada extremo del ARNip con desoxirribonucleótidos se tolera bien mientras que la sustitución completa con desoxirribonucleótidos provoca la ausencia de actividad iARN (Elbashir y col., 2001, *EMBO J.*, 20, 6877). Adicionalmente, Elbashir y col., mencionado anteriormente, también informan de que la sustitución de ARNip con 2'-O-metil nucleótidos 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 ARNip puede incluir modificaciones en la estructura 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 ARNip ni proporcionan ejemplos de dicho ARNip modificado. Kreutzer y Limmer, solicitud de patente canadiense N° 2.359.180, también describen determinadas modificaciones

químicas para su uso en las construcciones de ARNbc con el fin de contrarrestar la activación de la proteína quinasa PKR dependiente de ARN bicatenario, específicamente 2'-amino o 2'-O-metil nucleótidos y nucleótidos que contienen un puente 2'-O o 4'-C metileno. Sin embargo, Kreutzer y Limmer asimismo no logran demostrar hasta qué punto estas modificaciones se toleran en moléculas de ARNip ni proporcionan ningún ejemplo de dicho ARNip 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 ARNip largos (> 25 nt). Los autores describen la introducción de restos tiofosfato en estos transcritos de ARNip incorporando análogos nucleotídicos tiofosfato con ARN polimerasa T7 y T3 y observaron que "ARN con dos bases modificadas (fosforotioato) también tenían reducciones sustanciales en la eficacia ya que se desencadena iARN (datos no mostrados); la modificación de más de dos restos (fosforotioato) 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 ARNip largos y observaron que la sustitución de desoxinucleótidos por ribonucleótidos "producía una disminución sustancial en la actividad de interferencia", especialmente en el caso de sustituciones de uridina a timidina y/o citidina a desoxicitidina. Id. Además, los autores ensayaron ciertas modificaciones de bases, incluyendo sustituir 4-tiouracilo, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 3-(aminoalil)uracilo por uracilo e inosina por guanosina en las hebras con sentido y antisentido del ARNip, y descubrieron que mientras que el 4-tiouracilo y el 5-bromouracilo se toleraban bien, la inosina "producía una disminución sustancial en la actividad de interferencia" cuando se incorporaba en cualquier hebra. La incorporación de 5-yodouracilo y 3-(aminoalil)uracilo en la hebra antisentido también provocó una disminución sustancial en la actividad iARN.

Beach y col., publicación internacional PCT N° WO 01/68836, describen procedimientos específicos para atenuar la expresión génica usando ARNbc obtenido 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 ARNip específicas para ciertas aplicaciones genómicas funcionales y ciertas aplicaciones terapéuticas; aunque Tuschl, 2001, Chem Biochem., 2, 239-245, duda de que se pueda usar iARN para curar enfermedades genéticas o infecciones víricas debido "al peligro de activar respuesta de interferón". Li y col., publicación internacional PCT N° WO 00/44914, describen el uso de ARNbc específicos para uso en la atenuación de la expresión de ciertos genes diana. Zernicka-Goetz y col., publicación internacional PCT N° WO 01/36646, describen ciertos procedimientos para inhibir la expresión de genes particulares en células de mamífero usando ciertas moléculas de ARNbc. Fire y col., publicación internacional PCT N° WO 99/32619, describen procedimientos particulares para introducir ciertas moléculas de ARNbc en células para su uso en la inhibición de la expresión génica. Plaetinck y col., publicación internacional PCT N° WO 00/01846, describen ciertos procedimientos para identificar genes específicos responsables de conferir un fenotipo particular en una célula usando moléculas de ARNbc específicas. Mello y col., publicación internacional PCT N° WO 01/29058, describen la identificación de genes específicos implicados en iARN mediada por ARNbc. Deschamps Depaillette y col., publicación internacional PCT N° WO 99/07409, describen composiciones específicas que constan de moléculas de ARNbc particulares combinadas con ciertos 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 ARNip modificadas químicamente específicas que se dirigen al gen unc-22 de C. elegans. Tuschl y col., publicación internacional PCT N° WO 02/44321, describen ciertas construcciones de ARNip sintéticas.

Composiciones, usos de las mismas y procedimientos de la invención

La invención proporciona anticuerpos anti-Ovr110. Preferentemente, los anticuerpos anti-Ovr110 se internalizan tras la unión a Ovr110 en la superficie celular en una célula de mamífero. Los anticuerpos anti-Ovr110 también pueden destruir o conducir a la destrucción de células tumorales que portan Ovr110.

No era evidente que Ovr110 tenía capacidad de internalización. Además la capacidad de un anticuerpo de internalizarse 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 Ovr110 de superficie celular tiene capacidad de internalización tras la unión por los anticuerpos anti-Ovr110 de la invención. Adicionalmente, se demostró que los anticuerpos anti-Ovr110 de la presente invención pueden dirigirse específicamente a células tumorales que expresan Ovr110 in vivo e inhibir o eliminar estas células. Estas propiedades de dirección, internalización e inhibición del crecimiento del 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 incluyendo cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama. 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 cruza fácilmente la membrana plasmática (por ejemplo, la toxina caliqueamicina). La internalización no es necesaria si los anticuerpos o el agente conjugado con los anticuerpos no tienen sitios intracelulares de acción, por ejemplo, si el anticuerpo puede eliminar la célula tumoral por 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 la estadificación de cánceres que expresan Ovr110 (por ejemplo, en formación de radioimágenes). Pueden usarse solos o en combinación con otros marcadores de cáncer de ovario, incluyendo, aunque sin limitación, CA125, HE4 y mesotelina. Los anticuerpos

también son útiles para la purificación o inmunoprecipitación de Ovr110 a partir de células, para la 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 internalizantes de la invención pueden estar en diferentes formas abarcadas por la definición de "anticuerpo" 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 analiza con más detalle en las siguientes secciones, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido en la superficie celular puede inducir la citotoxicidad, por ejemplo, mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o reclutando el complemento en citotoxicidad dependiente del complemento o algún otro mecanismo. Como alternativa, cuando es deseable eliminar o reducir la función efectora, para minimizar los efectos secundarios o complicaciones terapéuticas, se pueden usar ciertas regiones Fc diferentes.

El anticuerpo puede competir por la unión, o se une sustancialmente a, el mismo epítipo unido por los anticuerpos de la invención. También se contemplan 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 por los hibridomas de acuerdo con los números de acceso a la ATCC PTA-5180, PTA-5855, PTA-5856, PTA-5884, PTA-6266, PTA-7128 y PTA-7129, incluyendo específicamente las características de dirección, internalización y cualquier inhibición de la proliferación celular o citotóxicas 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 o 21-35, 31-45, 41-55, 51-65, 61-75, 71-85, 81-95, 91-105, 101-115, 111-125, 121-135, 131-145, 141-155, 151-165, 161-175, 171-185, 181-195, 191-205, 201-215, 211-225, 221-235, 231-245, 241-255, 251-258 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. Dicho cáncer incluye cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama, cáncer del tracto urinario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pancreático y cáncer de ovario, 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 de ovario, pancreático, pulmonar o de mama. El anticuerpo es capaz de unirse a al menos una parte de las células cancerosas que expresan Ovr110 en el mamífero y preferentemente es uno que no induce o que minimiza la respuesta HAMA. Preferentemente, el anticuerpo es eficaz para destruir o eliminar células tumorales que expresan Ovr110 o para inhibir el crecimiento de dichas células tumorales, in vitro o in vivo, tras la unión a Ovr110 en la célula. Dicho anticuerpo incluye un anticuerpo anti-Ovr110 desnudo (no conjugado a ningún agente). Los anticuerpos anti-Ovr110 desnudos que tienen propiedades de inhibición del crecimiento tumoral in vivo incluyen los anticuerpos descritos en los siguientes Ejemplos Experimentales. Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento celular se pueden conjugar adicionalmente con un agente citotóxico para volverlos aún más potentes en la destrucción de las 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 describe más adelante. El agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento es preferentemente una molécula pequeña. Son preferibles toxinas tales como maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina o caliqueamicina y análogos o derivados de las mismas.

La invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención y un vehículo. Para propósitos de tratamiento del cáncer, las composiciones se pueden administrar al paciente en necesidad de dicho tratamiento, en el que la composición puede comprender uno o más anticuerpos anti-Ovr110 presentes en forma de inmunoconjugado o en forma de 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 composiciones útiles para tratar un cáncer que expresa Ovr110 o para aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-Ovr110 internalizante al mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpos se pueden

administrar a corto plazo (agudo) o de forma crónica o intermitente según lo indique el médico. También se proporcionan procedimientos in vitro y composiciones para su uso en la inhibición del crecimiento de y la eliminación de una célula que expresa Ovr110. Finalmente, la invención también proporciona kits y artículos de fabricación 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 encuentran uso en la detección de la expresión de Ovr110 o en ensayos terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, para ensayos de eliminación de células Ovr110 o para la purificación y/o inmunoprecipitación de Ovr110 a partir de células. Por ejemplo, para el aislamiento y purificación de Ovr110, el kit puede contener un anticuerpo anti-Ovr110 acoplado a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o perlas (por ejemplo, perlas de sepharose). Pueden proporcionarse kits que contengan anticuerpos para la detección y cuantificación de Ovr110 in vitro, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia de Western. Dicho anticuerpo útil para la detección se puede proporcionar con un marcador tal como un marcador fluorescente o radimarcador.

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 Ovr110 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 sobre-expresar Ovr110; ováricas, pancreáticas, de pulmón, mamarias u otra línea celular tumoral que exprese Ovr110) o se pueden usar membranas preparadas a partir de dichas células para generar los anticuerpos. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de Ovr110 humano y murino están disponibles como se ha 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 proteína de fusión para facilitar su aislamiento así como su identificación en diversos ensayos.

Los anticuerpos o proteínas de unión que se unen a diversas marcas y secuencias de fusión están disponibles como se detalla más adelante. Otras formas de Ovr110 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los especialistas en la técnica.

Marcas

En la técnica se conocen bien diversos polipéptidos marca y sus anticuerpos respectivos. Los ejemplos incluyen marcas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido marca HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Fiel y col., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)); la marca 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 marca de glucoproteína D del virus del 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 por 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 marca 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 marca de la proteína del gen T7 (Lutz Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87: 6393-6397 (1990)).

Anticuerpos policlonales

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) con una proteína que es inmunógena en las especies que se tienen que inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar con 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 celulares recombinantes como fusiones de proteína.

Se inmunizan animales contra el 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 por inyección subcutánea en sitios múltiples. Siete a 14 días más tarde, se toman muestras de sangre de los animales y se ensaya el suero para determinar el título del anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título alcanza la

meseta. Además, se usan agentes agregantes tales como alumbre de manera adecuada para potenciar la respuesta inmune.

Anticuerpos monoclonales

5 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature 256: 495 (1975) o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (patente de 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 celular de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies. Principles and Practice, pág. 103 (Academic Press, 1986)).

15 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 precursoras. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo de los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancia que evita el crecimiento de células sin capacidad HGPRT.

20 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 precursoras no fusionadas. Las líneas celulares 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 en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de 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, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

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

35 La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, por 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 deseadas se identifican, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución limitante y cultivar por 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 ascíticos en un animal, por ejemplo, por inyección i.p. de las células en ratones.

40 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o proteína G-Sepharose) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

45 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencía usando procedimientos convencionales (por ejemplo, por el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho 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. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993) y Phickthun, Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992).

55 Además, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas fágicas 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 fágicas. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (intervalo nM) por arrastre de cadena (Marks y col.,

Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación in vivo como estrategia para construir bibliotecas fágicas 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.

- 5 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 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 parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias
- 10 polipeptídicas no de 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

- 15 Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos se han descrito en la técnica. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos restos aminoacídicos no humanos con frecuencia se denominan restos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable importado". La humanización se puede realizar básicamente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann y col.,
- 20 Nature, 32: 323- 327 (1988); Verhoeyen y col., Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de 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 normalmente anticuerpos humanos en los
- 25 que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos 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 HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando el anticuerpo tiene por objeto el uso terapéutico humano. De acuerdo con el procedimiento
- 30 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 (FR) 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 consenso de
- 35 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)).

- Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la elevada afinidad de unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con el procedimiento
- 40 preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursora y humanizada. Están frecuentemente disponibles modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son familiares para los especialistas 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
- 45 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 influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar restos FR del receptor e importar secuencias de modo que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada por el
- 50 antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están implicados directamente y más sustancialmente en la influencia de la unión al antígeno.

- Se contemplan 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
- 55 citotóxicos con el fin de generar un inmunocnjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Anticuerpos humanos

Como 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 homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal provoca la inhibición completa de producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal provocará la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al 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 Immuno., 7: 33 (1993); patentes de Estados Unidos Nº 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y como alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty y col., Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo in vitro, a partir de repertorios de genes del dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, genes del 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 fágica. 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 provocan 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 del 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 Estados Unidos Nº 5.565.332 y 5.573.905. Como se ha analizado anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos por células B activadas in vitro (véanse las patentes de Estados Unidos Nº 5.567.610 y 5.229.275).

Fragmentos de anticuerpo

En ciertas 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 fágicas de anticuerpo analizadas 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 del epítipo de unión al receptor de recuperación se describen en la patente de Estados Unidos Nº 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los especialistas en la técnica. El anticuerpo de elección también puede ser un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patente de Estados Unidos Nº 5.571.894; y patente de Estados Unidos Nº 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por tanto, 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 Estados Unidos Nº 5.641.870, por ejemplo. Dichos 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 epítopes diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos se pueden unir a dos epítopes diferentes de la proteína Ovr110. Otros anticuerpos de este tipo pueden combinar un sitio de unión a Ovr110 con un sitio de unión a 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), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para enfocar y localizar los mecanismos de defensa celular contra 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-interferón- α , alcaloide de la vinca, 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-Fc γ RIII y la patente de Estados Unidos N° 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-Fc γ RI. En el documento WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fc α . La patente de Estados Unidos N° 5.821.337 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos 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 hibridomas (cuadromas) 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 Traunecker y col., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) se desvelan 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 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 produce rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadena deseada.

Preferentemente, los anticuerpos biespecíficos en 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 desvela 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 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 remplazan con cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales largas en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo remplazando 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. Dichos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir las células del sistema inmune a células indeseadas (patente de 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 desvelan en la patente de 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 presencia de un agente de formación de complejos ditiol, arsenita sódica, para estabilizar ditioles 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 por 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 sobre-expresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor mamario humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. 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 por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región 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 enlazador 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. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv (sFv) monocatenarios. Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. 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 consta de) 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 consta de) 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-enlazador 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.

Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones 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 delección, 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 post-traduccionales del anticuerpo anti-Ovr110, tales como cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo anti-Ovr110 que son emplazamientos preferidos para mutagénesis se denomina "mutagénesis por rastreo de 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 se

5

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

10

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 por rastreo de 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 un único resto aminoacídico o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo anti-Ovr110 con un resto de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo anti-Ovr110 incluyen la fusión al extremo N o C-terminal 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.

15

20

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 FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla I con el encabezado "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones provocan un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir más cambios

25

sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1 o como se describe 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 ejemplares	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; gln; 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

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:

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

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).

Un tipo particularmente preferido de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (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 precursor a partir del cual se generan. Una manera conveniente de generar dichas variantes sustitucionales implica la maduración por afinidad usando presentación en fago. En resumen, varios sitios de la 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 las variantes presentadas en fago se seleccionan de acuerdo con su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para modificación, se puede realizar mutagénesis por rastreo de alanina para identificar restos de la 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. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas detalladas en el presente documento. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe 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 glucosilación original del anticuerpo. Alterar significa delecionar uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación del anticuerpo es normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada 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 del 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 glucosilación potencial. Glucosilación ligada 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-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue de manera conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados 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 glucosilación ligados 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, aunque 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 al sitio), 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, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, se puede introducir un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de esa manera la formación de puentes disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o eliminación celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (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 ADCC 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 epítopo de unión a receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se ha descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítopo de unión a receptor de recuperación" se refiere a un epítopo 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 por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando células que expresan Ovr110 de forma endógena o tras su transfección con el gen de Ovr110. Por ejemplo, las líneas celulares tumorales 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 celular 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 tumoral es una que sobre-expresa Ovr110. Preferentemente, el anticuerpo anti-Ovr110 inhibirá la proliferación celular de una célula tumoral que expresa Ovr110 in vitro o in vivo en aproximadamente el 25-100 % en comparación con la célula tumoral 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 tumorales 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 provoca la reducción del tamaño del tumor o de la proliferación de las células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en 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 tumorales que expresan Ovr110 se incuban con medio solo 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. Después de cada tratamiento, las células se lavan y se distribuyen en alícuotas en 12 x 75 tubos tapados con filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la 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 el software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular determinados por la captación de PI pueden seleccionarse como anticuerpos inductores de muerte celular.

Para seleccionar anticuerpos que se unen a un epítopo en Ovr110 unidos por un anticuerpo de interés, por ejemplo, los anticuerpos contra 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 epítopo que un anticuerpo anti-Ovr110 de la invención. Como alternativa o adicionalmente, se puede realizar mapeado de epítopos por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de anticuerpos se puede mutagenizar tal como por rastreo de 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.

- 5 Por ejemplo, un procedimiento para explorar anticuerpos que se unen a un epítipo que se une por un anticuerpo de 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 contra Ovr110 unido a Ovr110 en la mezcla y se compara con el nivel de anticuerpo contra Ovr110 unido en la mezcla con una mezcla de control, donde el nivel de anticuerpo contra Ovr110 que se une a Ovr110 en la mezcla en
10 comparación con el control es indicativo de la unión del anticuerpo de ensayo a un epítipo que se une por el anticuerpo anti-Ovr110 de la presente invención. El nivel de anticuerpo contra Ovr110 unido a Ovr110 se determina por ELISA. El control puede ser un control positivo o negativo o ambos. Por ejemplo, el control puede ser una mezcla de Ovr110, anticuerpo contra Ovr110 de la presente invención y un anticuerpo que se sabe que se une al epítipo unido por el anticuerpo contra Ovr110 de la presente invención. El anticuerpo anti-Ovr110 se marca con un
15 marcador tal como los que se desvelan en el presente documento. El Ovr110 se puede unir a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o a perlas, por ejemplo, perlas de sepharose.

Inmunoconjugados

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

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

Maitansina y maitansinoides

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

- Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina fue el primero aislado del tosco arbusto africano *Maytenus serrata* (patente de Estados Unidos Nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (patente de Estados Unidos Nº 4.151.042). Se desvelan el maitansinol sintético y
30 derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las patentes de 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

- 35 En un intento por mejorar su índice terapéutico, se han conjugado la maitansina y maitansinoides con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nº 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DMI ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente tóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral in vivo. Chari y col. Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazador disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La
40 citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó in vitro sobre la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos superficiales HER-por célula. El fármaco conjugado consiguió un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando la cantidad de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

- 50 *Conjugados de anticuerpo anti-Ovr110 maitansinoide (inmunoconjugados)*

- Los conjugados anticuerpo anti-Ovr110-maitansinoide se preparan ligando químicamente un anticuerpo anti-Ovr110 con una molécula de maitansinoide son disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función
55 o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se desvelan, por

ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente mencionadas anteriormente en el presente documento. 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.

- 5 Existen muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para preparar conjugados anticuerpo-maitansinoide incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B 1, y Chari y col. Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos enlazadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos inestables a ácido, grupos fotoinestables, grupos inestables a peptidasa, o grupos inestables a esterasa, como se desvela en las patentes identificadas anteriormente, prefiriéndose los grupos disulfuro y tioéter.
- 10 Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide pueden prepararse usando una diversidad de agentes bifuncionales de acoplamiento proteico tales como (2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6diisocianato de tolueno), y compuestos bi-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen (2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y (2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

- El enlazador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo del enlace.
- 20 Por ejemplo, puede formarse un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede suceder en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la 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

- 25 Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo anti-Ovr110 conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos caliqueamicina es capaz de producir roturas en ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia caliqueamicina, véanse las patentes de Estados Unidos 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 American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, aunque 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 Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpo potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

- Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos anti-Ovr110 de la invención incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes de Estados Unidos 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5.877.296). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena de A de difteria, los fragmentos activos 1 5 no de unión de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de 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 adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

- Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está disponible una diversidad de isótopos radiactivos 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, puede comprender un átomo radiactivo para estudios centellográficos, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de espín para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, IRM), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111; flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de modos conocidos. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcadores tales como Tc^{99m} , I^{123} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , pueden unirse mediante un resto de cisteína en el péptido. El itrio-90 puede unirse mediante

un resto de lisina. Puede usarse 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 agente citotóxico pueden prepararse usando una diversidad de agentes bifuncionales de acoplamiento proteico tales como (2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído); compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6diisocianato de tolueno), y compuestos bi-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta y col. Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil metildietileno triaminapentaacético marcado con carbono (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador inestable a ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotoinestable, enlazador dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari y col. Cancer Research 52: 127-131 (1992); patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo anti-Ovr110 y el agente citotóxico, por ejemplo por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. 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 enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

Además, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en pre-direccionamiento tumor, en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después de la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Terapia de profármacos mediada por enzimas dependientes de anticuerpo (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase el documento W081/01145) en un fármaco anti-neoplásico activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de Estados Unidos N° 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal modo que lo convierta en su forma citotóxica más activa. Las enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-neoplásico, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serratía, 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, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas de escisión de carbohidrato tales como O-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; P-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con P-lactamas en fármacos libres; y penicilín amidasa, tales como penicilín V amidasa o penicilín G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describe en el presente documento para el suministro de la abzima a una población celular tumoral. Las enzimas de la presente invención pueden unirse covalentemente a los anticuerpos anti-Ovr110 por técnicas bien conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos reticulantes heterobifuncionales analizados anteriormente.

Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención ligada a al menos 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

En el presente documento se contemplan otras modificaciones del anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxiálquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmecrilato), respectivamente), en

sistemas coloidales de suministro de fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos anti-Ovr110 desvelados en el presente documento también pueden formularse en forma de inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para el suministro de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están habitualmente dispuestos en una formación bicapa, similar a la disposición lipídica de membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y el documento W097/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Se desvelan liposomas con tiempo en circulación potenciado en la patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Los liposomas particularmente útiles pueden generarse por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizado 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 pueden conjugarse con los liposomas como se describe en Martin y col. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma. Véase Gabizon y col. J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

Vectores. Células huésped y procedimientos recombinantes

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humanizado anti-Ovr110, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo. Para la producción recombinante del anticuerpo, se aísla la molécula de ácido nucleico que lo codifica y se inserta en un vector replicable para su clonación posterior (amplificación del ADN) o se inserta en un vector en unión funcional con un promotor para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencía usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, aunque 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 puede producirse de forma 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-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal del anticuerpo anti-Ovr110 nativo, la secuencia señal está sustituida con una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina II estable al calor. Para secreción en levaduras la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, el líder del factor oc (incluyendo los líderes del factor cc de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En expresión en células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora está ligado 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. Generalmente, en vectores de clonación, esta secuencia es una que posibilita que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencia de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas 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 2µ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión en mamíferos (el origen SV40 puede usarse normalmente sólo porque contiene el promotor temprano).

Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también llamado marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras

toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para bacilos. Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco que detiene el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y por tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que posibilitan la identificación de células competentes en la captación del ácido nucleico del anticuerpo anti-Ovr110, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc. Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero cultivado todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada, cuando se emplea DHFR de tipo silvestre, es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, células huésped (particularmente huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo anti-Ovr110, la proteína DHFR de tipo silvestre, y otro marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente de Estados Unidos N° 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su 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 para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4 Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura entonces proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación por cultivo en ausencia de triptófano. Asimismo, las cepas de levadura *Leu2*-deficientes (ATCC 20.622 ó 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que albergan el gen *Leu2*.

Además, pueden usarse vectores derivados del plásmido circular de 1,6 pm pKDI para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Como alternativa, se informó de un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina recombinante de ternera para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han desvelado vectores de expresión estables multi-copia para la secreción de albúmina sérica humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer y col., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo huésped y está unido de forma funcional al ácido nucleico del anticuerpo anti-Ovr110. Los promotores útiles para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de P-lactamasa y lactosa, el promotor de la fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*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 de forma funcional al ADN que codifica el anticuerpo anti-Ovr110.

Las secuencias promotoras son conocidas para eucariotas. Casi todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas. Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglicosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de cultivo, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Dichos vectores y promotores para su uso en expresión en levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. También se usan ventajosamente potenciadores de levaduras con promotores de levaduras.

La transcripción del anticuerpo anti-Ovr110 a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un

retrovirus, virus de la hepatitis-B y más preferentemente el virus de simio 40 (SV40), por promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, por promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente en forma de 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 convenientemente en forma de un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se desvela en la patente de Estados Unidos Nº 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos Nº 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 procedente del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous como promotor.

Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti-Ovr110 de la presente invención por eucariotas superiores a menudo se aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras son ahora conocidas procedentes de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 sobre el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma sobre el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede sufrir corte y ajuste en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia codificante del anticuerpo anti-Ovr110, pero está preferentemente localizado en un sitio 5' desde el promotor.

Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (levaduras, 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. Dichas secuencias están habitualmente disponibles a partir de 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 el anticuerpo anti-Ovr110. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona bovina del crecimiento. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

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 levaduras, o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito 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 desvelado 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.

Puede producirse el anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, y proteínas de fusión del anticuerpo en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glucosilación y la función efectora 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 la destrucción de la célula tumoral. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor semivida en circulación. La producción en E. coli es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo 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 describe la región de inicio de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la paste celular de E. coli en una fracción soluble y puede purificarse a través de, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede realizarse similar al procedimiento para purificar un anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Además de procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes del anticuerpo anti-Ovr110. Saccharomyces cerevisiae, o la levadura común del pan, es la más habitualmente usada entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, varios géneros, especies y cepas diferentes están habitualmente disponibles y son útiles en

el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *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* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-Ovr110 glucosilado se obtienen de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y las células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Está disponible 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 dichos virus pueden usarse como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos celulares vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, *Arabidopsis* y tabaco como huéspedes. Los vectores de clonación y expresión útiles en la producción de proteínas en cultivo celular vegetal son conocidos para los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Hiatt y col., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen y col. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsenko 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 vertebrados, y la propagación en células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 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 renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (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 una 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 los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Cultivo de células huésped

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo anti-Ovr110 de la presente invención pueden cultivarse en una diversidad de medios. Los medios disponibles en el mercado tales como FIO de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), las patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de Estados Unidos Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINA™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también puede incluirse a concentraciones apropiadas que serían conocidas para los especialistas en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para los especialistas en la técnica.

Purificación del anticuerpo anti-Ovr110

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como primera etapa, se retiran los desechos particulados, ya sean las células huésped o fragmento lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30

min. Los desechos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando se anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriormente para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que están basados en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (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. 5:15671575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es la mayoría de las veces agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliácido aspártico), cromatografía de SDS-PAGE, y precipitación en sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo a recuperar.

Tras cualquier etapa o etapas preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 - 4,5, preferentemente realizada a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, de 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 su almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores 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 estabilizadores aceptables son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones 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; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de 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 sódico; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivos tales como polisorbato; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo preferentemente comprende el anticuerpo a una concentración entre 5-200 mg/ml, preferentemente entre 10-100 mg/ml.

La formulación del 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 se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, además del anticuerpo anti-Ovr110 que se internaliza, puede ser deseable incluir en la formulación, un anticuerpo adicional, por ejemplo un segundo anticuerpo anti-Ovr110 que se une a un epítope diferente en Ovr110, o un anticuerpo contra alguna otra diana tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer particular. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente anti-hormonal, y/o cardioprotector. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden incluirse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metil-metacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices

de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-) hidroxibutírico.

Las formulaciones a usar para administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Procedimientos y tratamiento usando anticuerpo anti-Ovr110

De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo anti-Ovr110 que se internaliza tras la unión de Ovr110 sobre una superficie celular se usa para tratar a un sujeto que lo necesite que tiene un cáncer caracterizado por células cancerosas que expresan Ovr110, en particular, cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama, tal como adenocarcinoma seroso de mama o carcinoma ductal infiltrante de mama, y metástasis asociadas.

El cáncer generalmente comprenderá células que expresan Ovr110, de modo que el anticuerpo anti-Ovr110 es capaz de unirse a las mismas. Aunque el cáncer puede caracterizarse por la sobre-expresión de la molécula Ovr110, la presente solicitud proporciona adicionalmente una composición para su uso en el tratamiento de cáncer que no se considera que sea un cáncer de sobre-expresión de Ovr110.

La presente invención también se refiere a procedimientos para detectar células que sobre-expresan 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 la unión del anticuerpo a las 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 control de células. Un control adecuado es, por ejemplo, una muestra de células normales del mismo tipo que la muestra de ensayo o una muestra celular que se sabe que está libre de células que sobre-expresan Ovr110. Un nivel mayor de unión de Ovr110 que el de dicha muestra de control sería indicativo de que la muestra de ensayo contiene células que sobre-expresan Ovr110. Como alternativa, el control puede ser una muestra de células que se sabe que contiene células que sobre-expresan Ovr110. En dicho caso, un nivel de unión de anticuerpo contra Ovr110 en la muestra de ensayo que sea similar a, o en exceso de, el de la muestra de control sería indicativo de que la muestra de ensayo contiene células que sobre-expresan Ovr110.

La sobre-expresión de Ovr110 puede detectarse con diversos ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, sobre-expresión de Ovr110 puede ensayarse por inmunohistoquímica (IHC). Secciones tisulares impregnadas en parafina de una biopsia tumoral pueden someterse al ensayo IHC y se les puede conceder un criterio de intensidad de tinción de proteína Ovr110 del siguiente modo.

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

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

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

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

Aquellos tumores con valores de 0 ó 1+ para la expresión de Ovr110 pueden caracterizarse como sin sobre-expresión de Ovr110, mientras que aquellos tumores con valores de 2+ ó 3+ pueden caracterizarse como con sobre-expresión de Ovr110.

Como alternativa, o adicionalmente, pueden realizarse ensayos FISH tales como INFORM™ (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (VySiS, Illinois) sobre tejido tumoral impregnado en parafina, fijado en formalina para determinar el grado (si lo hay) de sobre-expresión de Ovr110 en el tumor. La sobre-expresión o amplificación de Ovr110 puede evaluarse 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 al paciente para la localización del marcador.

Una muestra sospechosa de contener células que expresan o sobre-expresan Ovr110 se combina con los anticuerpos de la presente invención en condiciones adecuadas para la unión específica de los anticuerpos contra Ovr110. La unión y/o internalización de los anticuerpos contra Ovr110 de la presente invención es indicativa de células que sobre-expresan Ovr110. El nivel de unión puede determinarse y compararse con un control adecuado, en el que un nivel elevado de Ovr110 unido en comparación con el control es indicativo de sobre-expresión de Ovr110. La muestra sospechosa de contener células que sobre-expresan Ovr110 puede ser una muestra celular cancerosa, particularmente una muestra de un cáncer de ovario, por ejemplo adenocarcinoma seroso de ovario, o un cáncer de mama, por ejemplo, un carcinoma ductal infiltrante de mama. Una muestra sérica de un sujeto también

puede ensayarse para los niveles de Ovr110 combinando una muestra sérica de un sujeto con un anticuerpo contra Ovr110 de la presente invención, determinando el nivel de Ovr110 unido al anticuerpo y comparando el nivel con un control, en el que un nivel elevado de Ovr110 en el suero del paciente en comparación con un control es indicativo de sobre-expresión de Ovr110 por las células del paciente. El sujeto puede tener un cáncer tal como, por ejemplo, un cáncer de ovario, por ejemplo adenocarcinoma seroso de ovario, o un cáncer de mama, por ejemplo, un carcinoma ductal infiltrante de mama.

Actualmente, dependiendo de la fase del cáncer, el tratamiento de cáncer de ovario, pancreático, pulmonía o de mama implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para retirar el tejido canceroso, radioterapia, privación de andrógenos (por ejemplo, terapia hormonal), y quimioterapia. La terapia con anticuerpos anti-Ovr110 puede ser especialmente deseable en pacientes ancianos que no toleran bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia, en enfermedad metastásica en que la radioterapia tiene utilidad limitada, y para el tratamiento de carcinoma prostático que es resistente al tratamiento de privación de andrógenos. Los anticuerpos anti-Ovr110 que están dirigidos al tumor y se internalizan en el mismo de la invención son útiles para aliviar los cáncer que expresan Ovr110, por ejemplo, cánceres de ovario, pancreático, pulmonar o de mama tras el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-Ovr110 puede usarse solo, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, compuestos antiangiogénicos, o radiomarcados, o con cirugía, crioterapia, y/o radioterapia, notablemente para cánceres de ovario, pancreático, pulmonar o de mama, también particularmente cuando no puede alcanzarse las células desprendidas. El tratamiento con anticuerpos anti-Ovr110 puede administrarse junto con otras formas de terapia convencional, de forma consecutiva con, previamente o posteriormente a terapia convencional. Se usan fármacos quimioterapéuticos tales como Taxotere® (docetaxel), Taxol® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona en el tratamiento de cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama metastático o refractario a hormonas, en particular, en pacientes de alto riesgo. En el presente uso de la invención para tratar o aliviar el cáncer, en particular, cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama independiente de andrógenos y/o metastásico, al paciente con cáncer se le puede administrar anticuerpo anti-Ovr110 junto con tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos precedentes. 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 puede administrarse junto con quimioterapia para potenciar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. La Physicians' Desk Reference (PDR) desvela dosificaciones de estos agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerán del cáncer particular que se esté tratando, el grado de la enfermedad y otros factores familiares para el médico especialista en la técnica y puede determinarlos el médico.

Particularmente, puede administrarse un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo anti-Ovr110 conjugado con un agente citotóxico al paciente. Preferentemente, el inmunoconjugado unido a la proteína Ovr110 se internaliza por la célula, provocando una eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la eliminación de la célula cancerosa a la que se une. Preferentemente, el agente citotóxico se dirige a o interfiere targets con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos se han descrito anteriormente e incluyen maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina, caliqueamicina, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

Los anticuerpos anti-Ovr110 o inmunoconjugados se administran a un paciente humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, en forma de un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Los anticuerpos o inmunoconjugados pueden inyectarse directamente en la masa tumoral. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo. Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con la administración del anticuerpo anti-Ovr110.

La administración combinada incluye co-administración, usando formulaciones diferentes o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente existe un periodo de tiempo mientras ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferentemente dicha terapia combinada provoca un efecto terapéutico sinérgico.

También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos anti-Ovr110, con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral asociado con el cáncer particular. Por tanto, la presente invención también se refiere a un "cóctel" de anticuerpos 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 tumorales que expresan Ovr110. El cóctel puede también comprender anticuerpos que están dirigidos a otros epítopes de Ovr110. Preferentemente los otros anticuerpos no interfieren con la unión y/o internalización de los anticuerpos de la presente invención.

El uso en tratamiento terapéutico de la presente invención 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 co-administración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalán, ciclofosfamida, hidroxiurea e hidroxiureataxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de

antraciclina. La preparación y los programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o pueden determinarlos empíricamente los especialistas en la técnica. La preparación y los programas de dosificación de dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1992).

5 El anticuerpo puede combinarse con un compuesto anti-hormonal; por ejemplo, un compuesto anti-estrógenos tal como tamoxifeno; un anti-progesterona tal como onapristona (véase, el documento EP 616 812); o un anti-andrógenos tal como flutamida, en dosificaciones conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer a tratar es cáncer independiente de andrógenos, el paciente puede haberse sometido previamente a terapia anti-andrógenos y, después de que el cáncer se haya convertido en independiente de andrógenos, puede administrarse el anticuerpo anti-Ovr110 (y opcionalmente otros agentes descritos en el presente documento) al paciente.

10 A veces, también puede ser beneficioso co-administrar un cardioprotector (para evitar o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a eliminación quirúrgica de las células cancerosas y/o radioterapia, antes, simultáneamente con, o posteriormente a la terapia con anticuerpos. Las dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes co-administrados anteriores son las actualmente usadas y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti-Ovr110.

15 Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, el médico elegirá la dosificación y el modo de administración de acuerdo con criterios conocidos. La dosificación apropiada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y transcurso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, las terapias previas, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el juicio del médico que esté atendiendo. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Preferentemente, el anticuerpo se administra por infusión intravenosa o por inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de 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 dosificación candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones diferentes, o por infusión continua. Un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis semanal de mantenimiento de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-Ovr110. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 pg/kg a o 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se sostiene el tratamiento hasta que suceda la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia puede controlarse fácilmente por procedimientos y ensayos convencionales basados en criterios conocidos para los médicos u otras personas especialistas en la técnica.

20 A parte de la administración de la proteína de anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo por terapia génica. Dicha administración de una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo está abarcada por 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.

25 Hay 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 terapia in vivo, la molécula de ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, habitualmente en el sitio donde se requiere el anticuerpo. Para tratamiento ex vivo, las células del paciente se retiran, se introduce la molécula de ácido nucleico en estas 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 Nº 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 en células cultivadas in vitro, o in vivo en las células del huésped pretendido.

30 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 procedimiento de precipitación con fosfato cálcico, etc. Un vector habitualmente usado para suministro ex vivo del gen es un vector retroviral.

35 Las técnicas actualmente preferidas de transferencia in vivo de moléculas de ácido nucleico incluyen transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simple I, o virus adeno-asociado) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para una revisión del marcaje génico y los protocolos de terapia génica actualmente 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

La invención también se refiere a un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para la detección de células que sobre-expresan Ovr110 y/o el tratamiento de cáncer que expresa Ovr110, en particular cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama. 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 adicionalmente un vehículo. El artículo de fabricación también puede comprender una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados por una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente alberga una composición que es eficaz para detectar células que expresan Ovr110 y/o para tratar una afección cancerosa y puede tener una entrada de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede estar en una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por 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 el cáncer de ovario, pancreático, pulmonar o de mama, o más específicamente cáncer o carcinoma ductal infiltrante de mama, en un paciente que lo necesite. La etiqueta o prospecto puede comprender adicionalmente instrucciones para administrar la composición de anticuerpo para un paciente con cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente 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 puede estar marcada con un marcador detectable tal como los descritos en el presente documento. El segundo recipiente puede contener, por ejemplo, un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial o del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles para diversos propósitos, por ejemplo, para ensayos de eliminación de células Ovr110, para la purificación o inmunoprecipitación de Ovr110 desde las células o para detectar la presencia de Ovr110 en una muestra sérica o detectar la presencia de células que expresan Ovr110 en una muestra celular. Para el aislamiento y purificación de Ovr110, el kit puede contener un anticuerpo anti-Ovr110 acoplado a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o perlas (por ejemplo, perlas de sepharose). Puede proporcionarse kits que contienen los anticuerpos para la detección y cuantificación de Ovr110 in vitro, por ejemplo en un ELISA o una transferencia de Western. Como 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 adicionalmente 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 descritos en el presente documento, por ejemplo, un radiomarcador, marcador fluorescente, o enzima, o el kit también puede comprender anticuerpos de control. Los componentes adicionales pueden estar dentro de recipientes diferentes dentro del kit. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso pretendido in vitro o de diagnóstico.

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

Los siguientes MAb/hibridomas de la presente invención se describen a continuación:

Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado 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, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2 y Ovr110.J3. Si se ha clonado el MAb, obtendrá la nomenclatura "X.1," por ejemplo, el primer clon de A7 se mencionará como A7.1, el segundo clon de A7 se mencionará como A7.2, etc. Para los propósitos de la presente invención, una referencia a A7 incluirá todos los clones, por ejemplo, A7.1, A7.2, etc.

Inmunógenos y antígenos (proteínas recombinantes, marcas HA e His y células transfectadas)

Para las construcciones de Ovr110 descritas a continuación, se insertaron moléculas de ácido nucleico que codifican regiones de Ovr110 en diversos vectores de expresión para producir proteínas recombinantes. Estas secuencias de ácido nucleico se aislaron usando cebadores, cuyo diseño es rutinario para los especialistas en la técnica. En algunos casos, los cebadores usados se incluyen en las siguientes descripciones de cada construcción.

Para propósitos de ilustración, también se incluye la secuencia de aminoácidos predicha codificada por cada construcción. Sin embargo, las construcciones pueden incluir variantes de origen natural (por ejemplo, variantes

alélicas, SNP) dentro de la región Ovr110 aislada por los cebadores. Estas secuencias variantes, y los anticuerpos que se unen a las mismas se consideran parte de la invención descrita en el presente documento.

Secuencia Ovr110A y producción de la proteína

Se insertó un ADN de longitud completa que codificaba la secuencia proteica Ovr110 inmadura completa desde Met1 hasta Lys282 (SEC ID N° 1) en un vector modificado que comprendía una secuencia de nucleótidos que codificaba una secuencia señal de secreción de 17 aminoácidos de la estañocalcina (STC) humana y una secuencia que codificaba una marca 6 His, para generar un vector que codificara una proteína de fusión Ovr110 recombinante que tuviera la señal de secreción enfocada al extremo N-terminal y la marca 6 His enfocada al extremo C-terminal de la proteína Ovr110. El vector resultante se usó para producir la proteína recombinante usando procedimientos convencionales. En resumen, las células transformadas con los vectores resultantes se cultivaron en condiciones adecuadas para la producción de la proteína Ovr110 recombinante. Las células transformadas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y se lisaron en 5 volúmenes (5 ml/g de células) de fosfato sódico 50 mM, pH 8,0, que contenía cloruro sódico 0,8 M, Zwittergent 3-14 al 0,3 % y fosfoglicósido de octilo al 0,1 % por sonicación. El material insoluble se aisló en forma de precipitado y se repitió la extracción dos veces. El precipitado aislado se disolvió en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, que contenía clorhidrato de guanidina 6 M (3 ml/g de células) y se hizo circular a través de una columna de 10 ml de Ni-NTA (Qiagen, Alameda, CA) equilibrada con el mismo tampón en un sistema Akta -100 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) para aproximadamente 40 volúmenes de columna (CV) al caudal de 5 ml/min. La columna después se lavó con 2 CV del mismo tampón fosfato-guanidina, 2 CV de imidazol 20 mM, 2 CV de imidazol 50 mM, y 4 CV de imidazol 100 mM en el anterior tampón fosfato-guanidina.

Secuencia de aminoácidos de Ovr110A (SEC ID N° 1)

1	11	21	31	41	51	
1	11	21	31	41	51	
MLQNSAVLLV	LVISASATMA	SLGQILFWSI	ISIIIIILAGA	IALIIGFGIS	GRHSITVTTV	60
61	ASAGNIGEDG	IQSCTFEPDI	KLSDIVIQWL	KEGVLGLVHE	FKEGKDELSE	QDEMFRGRTA 120
121	VFADQVIVGN	ASLRLKNVQL	TDAGTYKCYI	ITSKGKGNNAN	LEYKTGAFSM	PEVNVDYNAS 180
181	SETLRCEAPR	WFPQPTVWA	SQVDQGANFS	EVSNTSFELN	SENVTMKVVS	VLYNVTINNT 240
241	YSCMIENDIA	KATGDIKYTE	SEIKRRSHLQ	LLNSKASLCV	SSFFAISWAL	LPLSPYMLK 300
HHHHHH						

El vector resultante se usó para producir la proteína recombinante usando procedimientos convencionales. En resumen, las células transformadas con los vectores resultantes se cultivaron en condiciones adecuadas para la producción de la proteína Ovr110 recombinante. Las células transformadas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) y se lisaron en 5 volúmenes (5 ml/g de células) de fosfato sódico 50 mM, pH 8,0, que contenía cloruro sódico 0,8 M, Zwittergent 3-14 al 0,3 % y fosfoglicósido de octilo al 0,1 % por sonicación. El material insoluble se aisló en forma de un precipitado y se repitió la extracción dos veces. El precipitado aislado se disolvió en tampón fosfato sódico 50, pH 7,8, que contenía clorhidrato de guanidina 6 M (3 ml/g de células) y se hizo circular a través de una columna de 10 ml de Ni-NTA (Qiagen, Alameda, CA) equilibrada con el mismo tampón en un sistema Akta -100 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) para aproximadamente 40 volúmenes de columna (CV) al caudal de 5 ml/min. La columna después se lavó con 2 CV del mismo tampón fosfato-guanidina, 2 CV de imidazol 20 mM, 2 CV de imidazol 50 mM, y 4 CV de imidazol 100 mM en el anterior tampón fosfato-guanidina.

Ovr110A se eluyó con 4 CV de imidazol 500 mM en tampón fosfato-guanidina y la columna se lavó adicionalmente con 4 CV de fosfato sódico 50 mM, pH 7,6, que contenía imidazol 1 M y clorhidrato de guanidina 6 M. Las 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. Se recogieron los precipitados y se resuspendieron en un volumen más pequeño de PBS por sonicación breve.

Secuencia de Ovr1108 y producción de la proteína

Para la inmunización de ratones, se generó un fragmento proteico recombinante de Ovr110, que constituía solamente la parte extracelular predicha de la molécula, para seleccionar anticuerpos monoclonales (MAb) que se unieran a la superficie celular exterior. Se insertó un fragmento de ADN que codificaba la secuencia Ovr110 desde Gly30 (subrayada en la siguiente secuencia) hasta Lys282 (más una Met en la posición del codón de inicio) de la proteína inmadura, incluyendo el péptido señal, en un vector modificado, que contenía una secuencia de nucleótidos que codificaba una secuencia señal de secreción de 17 aminoácidos de la estañocalcina (STC) humana y una secuencia de nucleótidos que codificaba una marca 6 His de modo que el vector codificara una proteína de fusión Ovr110 recombinante que tuviera la secuencia señal de secreción de 17 aminoácidos de la estañocalcina (STC)

humana fusionada al extremo N-terminal y la marca 6 His enfocada al extremo C-terminal de la proteína Ovr110 (Ovr110B).

Secuencia de aminoácidos de Ovr110B (SEC ID N° 2)

1	11	21	31	41	51
1 MLQNSAVLLV LVISASATMG	ISGRHSITVT TVASAGNIGE	DGIQSCTFEP DIKLSDIVIQ			
61 WLKEGVLGLV HEFKEGKDEL	SEQDEMFRGR TAVFADQVIV	GNASLRLKNV QLTDAGTYKC			
121 YIITSKKGKN ANLEYKTGAF	SMPEVNVVDYN ASSETLRCEA	PRWFPQPTVV WASQVDQGAN			
181 FSEVSNTSFE LNSENVTMKV	VSVLYNVTIN NTYSCMIEND	IAKATGDIKV TESEIKRRSH			
241 LQLLNSKASL CVSSFFAISW	ALLPLSPYLM LKHHHHHH				

5 El vector resultante se usó para transformar bacterias DH10Bac para la generación del vector de infección por transposición. Los baculovirus recombinantes entonces se generaron por transfección de células Sf9 con el vector transpuesto. Se expresó Ovr110B recombinante por infección de la línea celular Hi5 con las partículas virales amplificadas y recogidas.

10 Se recogieron los medios de cultivos de las células Hi5 recombinantes a las 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 de cóctel inhibidor de proteasa. Los geles se vertieron en una columna SK y se lavaron con 2 CV de fosfato sódico 50 mM, pH 7,8, que contenía cloruro sódico 0,5 M. Ovr110B se eluyó por aumentos en etapas de imidazol en el mismo tampón fosfato-cloruro sódico (4 CV de 20 mM, 4 CV de 50 mM, 4 CV de 100 mM, 4 CV de 500 mM y 2 CV de 1000 mM).

15 Las muestras de las 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 y producción de la proteína para Ovr110 expresado en células de mamífero

20 Se generó una molécula de ácido nucleico que codificaba Ovr110 desde Gly30 hasta Lys282 a partir de un vector lanzadera que contenía un ADNc de longitud completa de Ovr110 (pDONR201_Ovr110) produciendo un fragmento de PCR usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

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).

25 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 comprendía una secuencia de nucleótidos que codificaba la señal de secreción de la estañocalcina 1 (STC-1) humana y la secuencia de nucleótidos que codificaba una marca de diez histidinas para producir el plásmido recombinante pCMV5jos2_Ovr110 que codificaba una proteína Ovr110 recombinante que tenía la señal de secreción de la estañocalcina 1 (STC-1) humana fusionada al extremo NH2 y una marca de diez histidinas fusionada en el extremo COOH, respectivamente. La secuencia Ovr110 está subrayada en la siguiente representación. Se realizó análisis de secuencia de ADN usando un kit de reacción listo para secuenciación con ciclo terminador ABI Prism Big Dye de PE Applied Biosystems (Foster City, CA).

30

Ovr110 con señal de secreción de STC-1 (SEC ID N° 5)

MLQNSAVLLVLVISASATHEAEQSRMHGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLS
DIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTDAGTY
KCYIITSKKGKNANLEYKTGAFSMPEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANF
SEVSNTSFE LNSENVTMKVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLL
NSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYMLKASHHHHHHHHHHH

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

Se recogió el medio de cultivo a las 48 horas después de la transfección. Se concentró el medio 10 veces, y se diafiltró con fosfato sódico 100 mM, NaCl 400 mM, glicerol al 10 %, pH 8,0. El medio concentrado que contenía

Ovr110 se pasó sobre una columna quelante de metal níquel de 5 ml (flujo rápido Ni-NTA, Qiagen Inc.), que se había equilibrado previamente con fosfato sódico 100 mM, NaCl 400 mM, glicerol al 10 %, pH 8,0. La columna después se lavó con 6 volúmenes de columna (CV) de fosfato sódico 100 mM, NaCl 400 mM, imidazol 2 mM, glicerol al 10 %, pH 8,0. Ovr110 se eluyó de la columna usando 22 CV de fosfato sódico 100 mM, NaCl 400 mM, glicerol al 10 %, pH 8,0 que contenía imidazol 5 mM e imidazol 500 mM, respectivamente. Las fracciones que

Secuencia de BTLA y producción de la proteína:

Se clonó una molécula de ácido nucleico que codificaba BTLA humana de longitud completa (hBTLA), desde Met1 hasta Ser289, por PCR a partir de bibliotecas de ADNc de glándula pituitaria y ganglio linfático usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

ATN551: 5'-CTT TGT TTA AAC ATG AAG ACA TTG CCT GCC ATG (SEC ID Nº 6) y
ATN552: 5'-CG GCT AGC ACT CCT CAC ACA TAT GGA TGC (SEC ID Nº 7).

La molécula de ácido nucleico aislada se insertó en un vector y la proteína codificada se muestra a continuación.

Secuencia de BTLA, longitud completa (SEC ID Nº 9)

**MKTLPAMLGTGKLFVFFLIPIYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANR
PHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNIFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLY
VTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREINL
VDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSV
IGLNSRLARNVKEAPTEYASICVRS**

Se clonó un gen truncado de hBTLA que codificaba Met1-Pro152, abarcando el dominio superficial de inmunoglobulina (Ig), por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de linfoma de Burkitt usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

ATN551: (véase la secuencia anterior) SEC ID Nº 6 y
ATN554: 5'-CG GCT AGC GGG TCT GCT TGC CAC TTC GTC (SEC ID Nº 8).

Se clonó una molécula de ácido nucleico que codificaba una forma secretada de longitud completa, que carecía del dominio transmembrana, de hBTLA, desde Met1-Ser241, por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de ganglio linfático usando los cebadores oligonucleotídicos ATN551 y ATN552. Los fragmentos de PCR se digirieron con PmeI y NheI y se ligaron en pCMV5HIS2 o pCMV5FcI, que se habían cortado con las mismas enzimas, para generar construcciones de proteína que tuvieran una extensión AS-HHHHHHHHHH o AS-dominio Fc de ratón (mFc) C-terminal, respectivamente. Se realizó análisis de secuencia de ADN usando un kit de reacción listo para secuenciación de ciclo terminador ABI Prism BigDye de PE Applied Biosystems (Foster City, CA).

BTLA, forma secretada (SEC ID Nº 10)

**MKTLPAMLGTGKLFVFFLIPIYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWC
KLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNIFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTGKQNELSDTA
GREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSV
IGLNSRLARNVKEAPTEYASICVRS**

BTLA5NT_mFc (BTLA secuenciada está subrayada) (SEC ID Nº 11)

**MKTLPAMLGTGKLFVFFLIPIYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWC
KLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNIFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTDVKSASERPS
KDEMASRPASENLYFQGPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDP
DVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMGKBEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGVR
APQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKNW
VERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSTRTPGK**

El plásmido recombinante, pCMV5FcI_BTLA5NT, que codificaba solamente el dominio superficial Ig de hBTLA fusionado a mFc (BTLA5NT_mFc), se usó para transfectar células 293T en cultivo en suspensión (un litro de medio sin suero) en un matraz rotativo. El medio de cultivo se recogió a las 48 horas después de la transfección. Se añadió cloruro sódico a 3 M final al medio recogido, y el medio se ajustó a pH 8,0. El medio que contenía BTLA entonces se

pasó sobre una columna de proteína A recombinante de 5 ml, que se había equilibrado previamente con 10 volúmenes de columna (CV) de borato 50 mM, NaCl 4 M, pH 8,0. La columna de proteína A después se lavó con 30 CV de borato 50 mM, NaCl 4 M, pH 8,0. BTLA5NT_mFc eluyó de la columna de proteína A usando 10 CV de citrato 100 mM, pH 3,0. Las fracciones que contenían BTLA5NT-mFc se neutralizaron con Tris-HCl 1 M, pH 9,0, y se dializaron en 3 l de PBS, pH 7,5.

Secuencia de Ovr107 y producción de la proteína

Se usó una proteína Ovr107 recombinante para seleccionar clones de hibridoma poli-reactivos. Ovr107 está regulada positivamente ampliamente en múltiples cánceres y la Ovr107 recombinante usada en el presente documento contiene una marca hexahistidina con potencial reactividad cruzada. Por tanto Ovr107 recombinante es útil para identificar anticuerpos poli-reactivos.

Se clonó un ADNc de longitud completa que codificaba la secuencia Ovr107 desde Met1 hasta Ile596 (documento WO 01/37864 marcador de cáncer de ovario Ovr107 humano) por PCR y se insertó en un vector. La región codificante de Ovr107 después se transfirió por recombinación en un vector que comprendía una secuencia de nucleótidos que codificaba una marca 6 His de modo que se generó una proteína de fusión de Ovr107 que tenía una marca 6 His fusionada a su extremo C-terminal.

Secuencia de aminoácidos de Ovr107 con marca His (SEC ID N° 12)

**MNRTWPRIWGSSQDEAELIREDIQGALHNYRSGRGERRAAALRATQEELQDRSPAAETPPLQRR
PSVRAVISTVERGAGRGRPQAKPIPEAEAAQRPEPVGTSNADSASPD LGPRGPD LV LQAEREVD
ILNHVFDDVESFVSR LQKSAEAAARVLEHRERGRSRRAAGEGLLTLRAKPPSEAEYTDVLQKIKY
AFSLLARLRGNIADPSSPELLHFLFGPLQMI VNTSGGPEFASSVRRPHLTSDAVALLRD NVT PREN
ELWTS LGDSWTRPGL ELSPEEGPPYRPEFFSGWEPVTD PQSRAWEDPVEKQLQHERRRRQQSAPQ
VAVNGHRDLEPESEPQLESETAGKWVLCNYDFQARNSS ELSVKQRDVLEVLD DSRKWWKVRDPAGQ
EGYVPYNILTPYPGPR LHHSQSPARSLNSTPPPPAPAPAPPALARPWRDRPRWDSCDSLNGLDP
SEKEKFSQMLIVNEELQARLAQGRSGPSRAVPGPRAPEPQLSPGSDASEVRAWLQAKGFSSSGTVDA
LGVLTGAQLFSLQKEELRAVSPEEGARVYSQVTVQRSLLLEDKEKVSELEAVMEKQKKKVEGEVEME
VIDPAFLYKVVRWAHHHHHH**

El vector resultante se usó para transformar bacterias DH10Bac para la generación del vector de infección por transposición. Después se generó el baculovirus recombinante por transfección de células Sf9 con el vector transpuesto. Se expresó Ovr107 recombinante por infección de líneas celulares Sf9 o Hi5 con las partículas baculovirales recombinantes amplificadas y recogidas.

Las células Hi5 infectadas con baculovirus recombinante se recogieron a las 48 h después de la infección. Las células se lavaron con DPBS y se lisaron en (5 ml/g de células) fosfato sódico 100 mM, pH 8,0, que contenía cloruro sódico 0,4 M, glicerol al 10 %, Triton X-100 al 1 % e imidazol 10 mM por sonicación. El extracto se incubó con 10 mg de DNasa 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 columna de 5 ml de Ni-NTA (Qiagen) equilibrada con fosfato sódico 0,1 M, pH 8,1, que contenía cloruro sódico 0,4 M y glicerol al 10 % al caudal de 3 ml/min. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna (CV) del mismo tampón de equilibrado y se eluyó Ovr107 por aumentos en etapas de imidazol en el tampón fosfato-cloruro sódico (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). Las fracciones se recogieron en 5 ml/tubo y las muestras de las fracciones recogidas se sometieron a SDS-PAGE y análisis de Western para evaluar la pureza de Ovr107. Las fracciones purificadas se combinaron y concentraron. Los productos finales se dializaron en PBS.

Generación de líneas celulares de ratón LMTK estables

Se transfectó un vector de mamífero que codificaba Ovr110 con marca HA C-terminal en células LMTK de ratón. Los transfectantes estables se seleccionaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/FBS al 10 %, con blastocidina a 10 ug/ml, durante 7-10 días, seguido de clasificación de células individuales (Coulter Elite, Beckmann Coulter, Sunnyvale, CA) basada en fluorescencia, a 1 célula/pocillo en placas de 96 pocillos. Las células LMTK transfectadas eran células cultivadas en placas de 96 pocillos (VWR, Brisbane, CA), expandidas en placas de 24 pocillos y posteriormente en placas de 6 pocillos. Después de una semana en cultivo, los clones individuales se ensayaron para la expresión de Ovr110 por transferencia de Western usando anticuerpo anti-HA (Covance, Richmond, CA). Se expandieron dos clones celulares LMTK que expresaban el mayor nivel de Ovr110-HA en matraces de 75 cm² (VWR) para explorar hibridomas, 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 cultivos clonales viables. A continuación se muestra una representación de la proteína codificada por el vector con la marca HA subrayada.

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

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	ITSKGKGNNAN	LEYKTGAFSM	PEVNVDYNAS 180
181	SETLRCEAPR	WFPQPTVVA	SQVDQGANFS	EVSNTSFELN	SENVTMKVVS	VLYNVTINNT 240
241	YSCMIENDIA	KATGDIKVTE	SEIKRRSHLQ	LLNSKASLCV	SSFFAISWAL	LPLSPYLMLK 300
	<u>YPYDVDPDYA</u>					

Generación de células 293F transfectadas transitorias

5 Se clonó una molécula de ácido nucleico que codificaba Ovr110 (SEC ID N° 13), sin la marca HA en el vector de expresión de mamífero, PCDNA3.1, y el vector recombinante se usó para transfectar células humanas 293F (Invitrogen). Se transfectaron cincuenta ml de células 293F cultivadas en medio freestyle (GIBCO) a 10^6 células/ml usando el reactivo de transfección 293fectin (Invitrogen), de acuerdo con las directrices del fabricante. El ADN, las células y el 293fectin se mezclaron en medio OPTI-MEM (GIBCO). Las células se usaron para su análisis 48 h después de la transfección.

10 *Inmunización*

Para la fusión de MAb de serie A, se inmunizaron ratones con proteína recombinante Ovr110B soluble. Para la fusión de MAb de serie C, se inmunizaron ratones con el dominio extracelular expresado en mamífero de Ovr110. Para la fusión de MAb de serie I, se inmunizaron ratones con la proteína Ovr110 derivada de insecto marcada con His como se ha descrito anteriormente.

15 Se inmunizaron grupos de 8 ratones BALB/c por vía intradérmica en ambas almohadillas plantares traseras. Todas las inyecciones fueron de 25 ul por pata. La primera inyección (día 1) de 10 ug 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 de oro Titermax (Sigma, Saint Louis, MS). Se realizaron inyecciones posteriores de 10 ug de antígeno por ratón los días 5, 9, 12, 16, 19, 23, 26, 29, 30 y constaron de 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 constó de antígeno diluido en DPBS solo. La fusión ocurrió el día 37.

Fusión de hibridoma

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

30 Estas células de ganglio linfático enriquecidas con células B primarias después se immortalizaron por electrofusión celular (BTX, San Diego, CA) con la línea celular 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 después de la fusión, facilitó la selección de una diversidad mayor de clones de hibridoma que producían anticuerpos específicos individuales. Los sobrenadantes de los pocillos se exploraron por ELISA, para la reactividad contra Ovr110B, 35 Ovr110A y la ausencia de reactividad cruzada con una proteína irrelevante (Ovr107).

Los cultivos monoclonales, que constaban de la descendencia genéticamente uniforme de células individuales, se establecieron después del procedimiento de exploración anterior, por clasificación de células viables individuales 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 tisular 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 anticuerpos

Se seleccionaron líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpo específico para Ovr110 por inmunoensayo en fase sólida ligado a enzimas (ELISA). Las proteínas Ovr110B u Ovr107 se adsorbieron de forma

5 inespecífica a pocillos de placas EIA de poliestireno de 96 pocillos (VWR). Se incubaron cincuenta μ l de proteína Ovr110B o conjugado péptido-BSA a 0,91 mg/ml en (DPBS) 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 se bloqueó la capacidad de unión no
 10 específica llenando completamente los pocillos con TBST/albúmina 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 μ l 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). Después se añadieron cien μ l de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Fc) conjugado con fosfatasa alcalina (Pierce Chemical Co., Rockford, IL), diluido 1:5000 en TBST/BSA a cada pocillo y
 15 se incubaron durante 1 hora a TA. Los pocillos después se lavaron 3 veces con TBST. Después se añadieron cien μ l de sustrato de fosfatasa alcalina paranitrofenilfosfato (pNPP) (Sigma) a 1 mg/ml en tampón dietanolamina 1 M pH 8,9 (Sigma) a cada pocillo y se incubaron durante 20 min. a TA. La actividad fosfatasa alcalina unida se indicó por 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.

Exploración ELISA de MAb contra Ovr110

Después de 2 semanas de cultivo, los hibridomas con sobrenadantes que producían valores de absorbancia ELISA mayores de 1,0 con Ovr110B y menores de 0,2 con Ovr107, se volvieron a distribuir a partir de veinticinco placas de cultivo de 96 pocillos, en placas de cultivo de 96 pocillos nuevas y se cultivaron durante una semana adicional.

20 Después de una semana adicional de cultivo, se seleccionaron 12 hibridomas de la serie A y 15 de la serie C, con sobrenadantes que producían valores de absorbancia ELISA mayores de 1,0 con Ovr110B (Tablas 1A y 1B) y menores de 0,2 con Ovr107, para la clonación de células individuales en placas de cultivo de 96 pocillos, por clasificación celular (Coulter Elite).

25 TABLA 1A: RESULTADOS DEL ENSAYO DE CLONES DE CÉLULAS INDIVIDUALES DE MAb DE LA SERIE A CONTRA Ovr110

Nº clon	DO ELISA (405 nm)	Nº pocillo original	Densidad de placa	Extensión (Nº clones/placa de 96 pocillos)	Procedimiento de siembra en placa	DO ELISA del clon Mab (405 nm)
A7.1	2,3172	1	1 célula/pocillo	3	Clasificación	3,5388
A7.2	2,1940	3	1 célula/pocillo		Clasificación	3,7160
A10.1	1,5391	1	1 célula/pocillo	2	Clasificación	3,1965
A10.2	3,9733	G10	1 célula/pocillo		Clasificación	2,2502
A13.1	2,0736	2	1 célula/pocillo	18	Clasificación	3,3627
A13.2	2,0000	3	1 célula/pocillo		Clasificación	3,5381
A31.1	2,7208	1	1 célula/pocillo	8	Clasificación	3,6109
A31.2	2,4506	2	1 célula/pocillo		Clasificación	3,0818
A57.1	2,8313	1	1 célula/pocillo	27	Clasificación	3,6099
A57.2	2,7821	3	1 célula/pocillo		Clasificación	3,9733
A72.1	2,6737	1	1 célula/pocillo	13	Clasificación	3,6999

ES 2 402 277 T3

A72.2	2,6059	5	1 célula/pocillo		Clasificación	4,0000
A77.1	1,6650	1	1 célula/pocillo	2	Clasificación	1,5370
A77.2	1,8328	4	1 célula/pocillo	3	Clasificación	1,6186
A102.1	2,1280	2	1 célula/pocillo	4	Clasificación	1,1054
A102.2	1,4710	3	1 célula/pocillo		Clasificación	1,0121

A87.1	2,1396	3	1 célula/pocillo	13	Clasificación	1,8355
A87.2	1,9965	4	1 célula/pocillo		Clasificación	1,9795
A89.1	3,0326	7	1 célula/pocillo	16	Clasificación	1,9081
A89.2	3,0013	8	1 célula/pocillo		Clasificación	1,9666
A99.1	3,2165	2	1 célula/pocillo	4	Clasificación	1,8815
A99.2	3,4925	4	1 célula/pocillo		Clasificación	2,0927

TABLA 1B: RESULTADOS DEL ENSAYO DE CLONES DE CÉLULAS INDIVIDUALES DE MAb DE LA SERIE C CONTRA Ovr110

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

5

Resultados de la exploración ELISA de los MAb clonados contra Ovr110

Después de 2 semanas de cultivo, se ensayaron los sobrenadante de 2 clones de hibridoma de cada hibridoma precursor para la producción de valores de absorbancia ELISA mayores de 1,5 con Ovr110B (Tablas 1A y B) o péptidos 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.A77.1r, 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 se seleccionaron todos para aumento en escala para ensayo inmunohistoquímico, de inmunofluorescencia y funcional.

10

Exploración FACS para determinar la unión a superficie celular de MAb contra Ovr110

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

Las células se distribuyeron en alícuotas a 0,5-1,0x10⁶ 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 vortical para resuspender las células, después se añadieron 200 ul de DPBS/FBS al 3 %/azida Na al 0,01 % (tampón FACS) a cada pocillo. Se repitieron la centrifugación y la aspiración, 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 de burro anti-Fc de IgG de ratón 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 su análisis en el clasificador celular o citómetro de flujo. En ciertos casos, para su 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 su fijación, después se aumentó el volumen hasta 250 ul con DPBS. Las células teñidas se analizaron en un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) Elite (Beckman Coulter, Miami, FL).

Los resultados de un experimento representativo que demuestran la expresión en la superficie celular por análisis FACS se representan en la Figura 1. La unión del MAb A7.1 contra Ovr110, seguida por la unión del conjugado de burro anti-IgG de ratón-PE (DAMPE) produjo un 49 % de células LMTK de ratón transfectadas con Ovr110 que eran positivas, con una intensidad de fluorescencia (intensidad de fluorescencia media, MFI) 7,5 veces más elevada que las células teñidas con DAMPE solo. Se presentan datos de análisis FACS adicionales con líneas celulares tumorales humanas en la siguiente Tabla 2. Como puede observarse 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 MAb de control negativo Pro104.D9.1 se unió a menos del 2 % de estas mismas células obtenidas de cáncer de mama. 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 celular de cáncer de colon HT29.

TABLA 2a: UNIÓN DE MAb CONTRA Ovr110 A LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA VIABLE SKBR3

	SKBR3		HT29	
Clon MAb	% de células positivas	MFI	% de células positivas	MFI
Ninguno	3,2	0,35	1,4	0,316
Ovr110.A7.1	66,3	4,56	0,7	0,918
Ovr110.A57.1	9,8	0,82	1,2	0,385
Ovr110.A72.1	6,0	0,741	0,6	0,969
Ovr110.AS7.1	52,6	4,08	0,6	0,842
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

5

Se exploraron los sobrenadantes de la fusión de los anticuerpos de la serie I contra Ovr110 por un ensayo ELISA (descrito anteriormente) contra la proteína Ovr110 obtenida de insecto y la proteína de fusión Ovr110-Fc de Ig humana obtenida de células de mamífero 293F y una proteína de control negativo. Veintidós pocillos fueron reactivos tanto a la proteína de insecto como a la de mamífero y no reactivos sobre la proteína de control negativo. Cuando se ensayaron por citometría de flujo sobre células 293F transfectadas con y la línea celular precursora no transfectada, 5 anticuerpos (I2, I3, I4, I11 e I20) mostraron un elevado nivel de reactividad con la proteína de superficie celular Ovr110 y reactividad insignificante con la línea de control precursora.

TABLA 2b: CÉLULAS 293F TRANSFECTADAS CON MAb CONTRA Ovr110

Muestra	Células 293F transfectadas con Ovr110		Células 293F no transfectadas	
	% de células positivas	MFI	% de células positivas	MFI
Sin tinción	1,3	0,322	3,6	0,324
GAMBio SAPE	0,5	0,282	5,3	0,359
SAPE solo			4,7	0,349
Ovr110.A57.1 (+)	99,3	56,5	6	0,38
Ovr110.C3.2 (+)	98,8	64,9	4,9	0,357
Pro104.D9.1 (-)	1	0,296	4,2	0,344
Anti-Ricina	0,6	0,287	6,2	0,365
Anti-CD71	99,5	23,9	99,6	17,9
Ovr110.I1	0,4	0,28		
Ovr110.I2	97,8	33,9	10,7	0,41
Ovr110.I3	89,2	16,9	9,3	0,4
Ovr110.I4	98,7	50,8	8,5	0,391
Ovr110.I6	1	0,297		
Ovr110.I7	0,9	0,29		

Ovr110.I8	10,9	0,433		
Ovr110.I9	0,4	0,286		
Ovr110.I10	0,9	0,293		
Ovr110.I11	71,6	1,44	9,3	0,401
Ovr110.I13	0,4	0,286		
Ovr110.I14	0,5	0,294		
Ovr110.I15	0,7	0,286		
Ovr110.I16	0,4	0,292		
Ovr110.I17	5	0,321		
Ovr110.I18	0,5	0,291		
Ovr110.I20	90,1	4	7,8	0,382
Ovr110.I21	0,9	0,297		
Ovr110.I22	0,6	0,285		
Ovr110.J1	14,2	0,378	87,6	1,55
Ovr110.J2	1,1	0,297		
Ovr110.J3	1,4	0,314		

Isotipos de MAb contra Ovr110

Los isotipos de los MAb se determinaron usando kits de ensayo por inmunoensayo de isotipado de anticuerpo monoclonal de ratón disponibles en el mercado (IsoStrip, Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN). Los resultados del isotipado se enumeran en la Tabla 3. Todos los MAb fueron del isotipo IgG1/κ, excepto el MAb A10.1 contra Ovr110, que fue del isotipo IgG2b/κ.

5

TABLA 3: ISOTIPOS DE MAb CONTRA 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
A102.1	IgG1 : Kappa
A107.1	IgG 1 : 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 contra Ovr110

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 contra Ovr110.

El anticuerpo de conejo anti-Fc de IgG de ratón (Biacore) se inmovilizó en las celdas de flujo 2, 3 y 4 de un chip detector CM5 (Biacore) por acoplamiento amina convencional (Biacore). La celda de flujo uno se usó como superficie de blanco para sustracciones de referencia, y se activó y después se inactivó con etanolamina. Los MAb contra Ovr110 se capturaron sobre el chip recubierto con anticuerpo de conejo anti-Fc de IgG de ratón, seguido por unión del antígeno. Por lo tanto, estas mediciones deben representar afinidades 1:1 reales y no efectos de avididad que se observan con inmovilizaciones directas de antígeno, debido a la naturaleza divalente de los anticuerpos IgG. Los MAb se diluyeron en tampón HBS EP (Biacore) hasta 15 ug/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 ul/minuto. El nivel de captura de MAb varió entre 200 y 300 unidades de respuesta (UR) por celda de flujo. Tras la captura de MAb se permitió que la superficie se estabilizara durante 3 minutos. Después se dejó fluir el antígeno Ovr110B (1,56 mg/ml) sobre los MAb capturados a 20 ul/minuto en las celdas de flujo y a través de la celda de flujo de blanco, durante 4 minutos, a concentraciones sucesivas de 144, 72, 36, 18, 9, 4,5 ul/ml. Como 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 uM. Se realizaron dos ciclos duplicados para cada concentración de antígeno o tampón. Se permitió un tiempo de disociación de 420 segundos entre ciclos y la regeneración de las superficies del chip al anticuerpo anti-Fc de 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.

Los datos resultantes se analizaron mediante el software BiaEvaluation (Biacore) usando un ajuste global simultáneo k_a/k_d asumiendo unión de Langmuir. El parámetro R_{max} del software se ajustó a local para permitir la compensación de variaciones menores en la etapa de captura del anticuerpo anti-Fc de 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.

TABLA 4: AFINIDADES DE MAb CONTRA Ovr110

mAb contra Ovr110	KD (M)	KA (MS)	kd (1/s)	ka (1/Ms)
A57.1 (AN-mamífero)	7,66E-10	1,31E+09	3,60E-05	4,70E+04
A57.1 (SZ-mamífero)	7,80E-10	N/A	N/A	N/A
A7.1 (AN-mamífero)	2,65E-09	3,78E+08	4,50E-05	1,70E+04
A72.1 (DB-insecto)	9,93E-10	1,01E+09	1,35E-05	1,36E+04
A72.1 (AN-mamífero)	1,19E-09	8,40E+08	5,00E-05	4,20E+04
C3.2 (AN-mamífero)	8,00E-09	1,25E+08	1,20E-04	1,50E+04
C6.3 (AN-mamífero)	9,57E-10	1,05E+09	2,20E-05	2,30E+04
C12.1.1	7,75E-07	1,29E+06	9,30E-04	1,20E+03

Transferencias de Western

Se prepararon extractos proteicos para análisis de transferencia de Western en tampón de lisis celular (NP-40 al 1 %, fosfato sódico 10 mM, pH 7,2, cloruro sódico 150 mM) a partir de transfectantes Ovr110-293T y líneas celulares de adenocarcinoma de mamífero. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles NuPAGE con Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en condiciones desnaturalizantes en un aparato de gel Novex-XCell II Minicell (Invitrogen, Life Tech) y se transfirieron posteriormente a membranas de PVDF usando un módulo XCell Blot (Invitrogen Life Technologies). Tras 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 contra 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 de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano rústico (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) y finalmente se visualizaron por quimoluminiscencia usando un kit de detección de transferencia de Western avance ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Se realizaron experimentos de desglucosilación sobre extractos proteicos a partir de transfectantes Ovr110-293T, líneas celulares de adenocarcinoma de mamífero positivas a ARNm de Ovr110 (QPCR +) y negativas a ARNm de Ovr110 (QPCR-) y tumores de ovario usando Péptido N-Glucosidasa F (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las muestras desglucosiladas después se analizaron por transferencias de Western como se ha descrito anteriormente. En resumen, se desnaturalizaron 100 ug de extracto proteico en tampón desnaturalizante de glucoproteína (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 sódico 50 mM antes de la adición de 100 unidades de PNGasa F y se incubaron a 37 °C durante 4 horas.

TABLA 5A: RESULTADOS DE LAS TRANSFERENCIAS DE WESTERN USANDO MAB CONTRA OVR110 CON EXTRACTOS DE CÉLULAS 293T TRANSFECTADAS Y LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS DE MAMA, OVARIO Y COLON

	A10.1	A13.1	A72.1	A31.1	A57.1	A77.1	A89	A107
Ovr110-HA-293T	+ múltiples bandas banda principal a 49-60 kDa y banda minoritaria a ~30 kDa	+ múltiples bandas banda principal a 49-60 kDa y banda minoritaria a ~30 kDa	+ múltiples bandas banda principal a 49-60 kDa y banda minoritaria a ~30 kDa	+ múltiples bandas banda principal a 49-60 kDa y banda minoritaria a ~30 kDa	+ múltiples bandas banda principal a 49-60 kDa y banda minoritaria a ~30 kDa	+ múltiples bandas banda principal a 49-60 kDa y banda minoritaria a ~30 kDa	+ múltiples bandas banda principal a 49-60 kDa y banda minoritaria a ~30 kDa	+ múltiples bandas banda principal a 49-60 kDa y banda minoritaria a ~30 kDa
Ovr110-HA-293T desglucosilada					Banda principal a ~30 kDa banda minoritaria a ~16 kDa			
MCF7 y 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 y SKBR3 desglucosiladas (QPCR +)					~30 kDa			
CaOV3 y HT29 (QPCR-)	-	-	-	-	-	-	-	-

Los resultados de los experimentos de transferencia de Western se resumen en las Tablas 5A y 5B. Como puede observarse, los MAb contra 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 minoritarias del tamaño pronosticado para la proteína Ovr110

desglucosilada (30 kDa) y bandas principales a 49-60 kDa, en lisados de células 293T humanas transfectadas con Ovr110. Las bandas más grandes eran coherentes con la presencia de varios sitios de glucosilación en la proteína Ovr110. Las bandas principales de 50-60 kDa también se detectaron por los mismos MAb contra Ovr110, en lisados de las líneas celulares de cáncer de mama humano QPCR + SKBR3 y MCF7 (ATCC, Manassas, VA), pero no se detectaron en lisados de las líneas celulares QPCR - CaOV3 y HT29 (ATCC). La desglucosilación con PNGasa redujo el tamaño de las bandas detectadas por el MAb contra Ovr110 A57.1 desde ~60 kDa (glucosilado) hasta ~30 kDa (tamaño desglucosilado pronosticado), en lisados de células 293T humanas transfectadas con Ovr110 y en lisados de las líneas celulares de cáncer de mama SKBR3 y MCF7 (ATCC). La desglucosilación de lisados de 3 muestras tumorales de ovario con PNGasa F también redujo el tamaño de las bandas detectadas por el MAb contra Ovr110 57.1 desde ~60 kDa (glucosilado) hasta ~30 kDa.

TABLA 5B: RESULTADOS DE LAS TRANSFERENCIAS DE WESTERN USANDO MAB CONTRA OVR110 CON EXTRACTOS DE LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS DE MAMA Y COLON

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

Ejemplo 2: Unión a superficie celular de MAb contra Ovr110 en células cancerosas vivas demostrada por inmunofluorescencia

Se usaron las siguientes líneas celulares cancerosas en este estudio: OvCar-3 de ovario, CaOV-3 de ovario y SKBr-3 de mama. Las células OvCAR-3 y SKBR-3 pero no las células CaOV-3 de control expresan Ovr110.

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

Se ensayaron once MAb contra 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) para determinar qué anticuerpo se une a la superficie celular de células cancerosas que expresan Ovr110. Se añadieron MAb primarios al medio a una concentración final de 10 ug/ml y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Tras la fijación con formaldehído al 3 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS), las células se incubaron con un anticuerpo secundario de burro anti-ratón marcado con Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) a una concentración de 10 ug/ml durante 30 min. Tras el lavado, las células se montaron en un medio que contenía 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 equipado con los filtros fluorescentes apropiados. Se obtuvieron micrografías con una cámara CCD.

Resultados

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 cancerosas de ovario OvCAR-3 (flechas en A) y células cancerosas de mama SKBR-3 (flechas en B). La membrana celular de las células CaOV-3, una línea celular de control que no expresa Ovr110, no se marcó cuando las células se incubaron con el mismo anticuerpo (Fig. 2C).

Unión e internalización en células cancerosas vivas

Este estudio se realizó usando anticuerpos fluorescentes. Marcando los anticuerpos con el colorante fluorescente Cy3, se puede visualizar la unión e internalización de los anticuerpos por microscopía de fluorescencia. La tecnología está bien establecida. Se usaron células OvCAR-3 que no expresan Ovr110 como controles negativos.

Conjugación con Cy3

Se marcaron Ovr110.A7.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A72.1, Ovr110.A57.1 y Ovr110.A87.1 con Cy-3. La conjugación con Cy3 se realizó de acuerdo con procedimientos convencionales y las directrices del fabricante. En resumen, se

dializó 1 mg de anticuerpo frente a tampón 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 se midió la concentración en un espectrómetro a 280 nm.

- 5 Después se incubaron los MAb Ovr110.A7.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A72.1, Ovr110.A57.1 y Ovr110.A87.1 a una concentración de 10 ug/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. Tras la fijación, se montaron los cubreobjetos con las células en un medio que contenía DAPI (Vectastain) para visualizar los núcleos celulares y se observaron en un Zeiss Fluorescence Microscope Axiophot equipado con los filtros fluorescentes apropiados. Se obtuvieron micrografías con una cámara CCD a color.

Resultados

- 15 La microscopía de inmunofluorescencia de células cancerosas tratadas con Cy3-Ovr110.A7.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A72.1, Ovr110.A57.1 y Ovr110.A87.1 indicó que las células cancerosas que expresaban Ovr110 se unen a e internalizan los anticuerpos fluorescentes en grado variable. La Fig. 3A (flechas) muestra que tras la unión, Cy3-Ovr110.A57.1 se internaliza por las células SKOV-3 y a un menor grado por las células SKBr-3 (Fig. 3B). Se observó ausencia de unión o baja unión de Cy3-Ovr110.A57.1 en las células de control CaOV-3 (Fig.3C). La tinción del 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

- 20 Los MAb contra Ovr110 se internalizan in vitro tras la unión a Ovr110 en la superficie celular de células cancerosas que expresan Ovr110.

Distribución de Ovr110 en tejidos tumorales y normales evaluada por inmunohistoquímica

Tejidos

- 25 Se obtuvieron bloques impregnados en parafina fijados con formalina de tejidos cancerosos y adyacentes normales de mama y ovario del National Research Interchange (Filadelfia, PA). Los bloques impregnados en OCT de órganos normales se obtuvieron de Zoion (Hawthorne, NY).

Tinción inmunohistoquímica para secciones impregnadas en parafina fijadas con formalina

- 30 Se hornearon secciones de seis µm de grosor cortadas a parir de bloques impregnados en parafina fijados con formalina 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 hirviendo los portaobjetos de las secciones en tampón citrato sódico 10 mM (pH 6,0) a 120 °C, 103,39 ~ 117,18 KPa (15 ~ 17 PSI) en una cámara de recuperación (Biocare, Walnut Creek, CA) durante 10 min. La actividad peroxidasa endógena se inactivó por tratamiento con solución de peróxido de hidrógeno al 3 % durante 15 min. Los portaobjetos se incubaron con BSA al 1 % para bloquear la unión no específica de anticuerpo y después se hicieron reaccionar con 6 MAb contra Ovr110 primarios diferentes usados a una concentración de 1 ug/ml durante 1 hora a temperatura ambiente en un teñidor automático 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 anticuerpo anti-IgG de ratón como anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP). Después de lavar en TBS con Tween-20 al 0,5 %, las secciones se visualizaron por cromógeno 3,3-diaminobenzidina durante 2 ~ 5 minutos (Immunovision Technologies, Co. Daly City, CA) y se tiñeron con contraste con hematoxilina antes de montarlas en medio Permout después de deshidratación. La IgG de ratón normal en la misma concentración que el anticuerpo primario sirvió como controles negativos.

Tinción inmunohistoquímica para secciones no fijadas congeladas impregnadas en OCT

- 45 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 aclararon 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

- 50 Se usaron Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A57.1 y Ovr110.A87.1 para inmunomarcarse secciones de muestras clínicas de adenocarcinoma seroso de ovario. La Figura 4 muestra la distribución de Ovr110 en tumores de ovario evaluada por IHC usando Ovr110.A57.1.

Trece de las quince muestras clínicas (87 %) mostraron inmunomarcaje positivo usando Ovr110.A57.1 mientras que catorce de quince (93 %) fueron positivas usando Ovr110.A13.1 (Tabla 6A). La inmunotinción específica estuvo

restringida a las células epiteliales en los tumores y la cantidad 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 fuerte tinción de membrana (flechas) con una tinción citoplasmática menos intensa y sin tinción de fondo en el estroma. La Fig. 4C muestra ausencia de marcaje específico en un experimento de control en el que el anticuerpo primario se reemplazó con una fracción de IgG de ratón.

Ocho de diez (80 %) muestras clínicas de cáncer de mama 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 de mama. El marcaje estuvo restringido a la superficie celular de las células epiteliales de los tumores (Fig. 5A y B, flechas). La Fig. 5C muestra la ausencia de marcaje específico en un experimento de control en el que el anticuerpo primario se reemplazó con una fracción de IgG de ratón. Según la intensidad del inmunomarcaje, el nivel de expresión de Ovr110 en los tejidos neoplásicos de ovario y mama era elevado. Se investigó una cantidad limitada 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 inmunomarcaje obtenido usando Ovr110.A57.1 en muestras clínicas de adenocarcinoma pancreático. El marcaje esta restringido a la superficie celular de las células epiteliales (flechas). No se observó marcaje específico cuando se usó IgG de ratón normal en lugar de Ovr110.A57.1. Se descubrió que tejidos de cáncer pulmonar también eran positivos para inmunomarcaje con A7.1, A13.1 y A31.1 (2/2, 2/3 y 1/2 casos respectivamente).

También se analizó la expresión de Ovr110 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. También se marcó la membrana apical de los ductos mamario y pancreático normales.

Tabla 6A: Resumen de los resultados inmunohistoquímicos que muestran la cantidad de casos positivos en muestras tisulares humanas normales y muestras clínicas de cáncer de ovario, de mama y pancreático.

MAb	Cáncer de ovario	Ovario normal	Cáncer de mama	NAT* de mama	Mama normal	Cáncer pancreático	Páncreas normal	Cáncer pulmonar	Pulmón normal
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 normal adyacente									

Tabla 6B: Unión de MAb contra 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+ apical M	-	-	-
Controles					
Pro10.4 D133.1	2 ug/ml	-	-	-	
E-cadherina	0,25 ug/ml	3+ M	-	-	-
IgG1	10 ug/ml	-	-	-	-
* Clasificación 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 puede usarse como indicador altamente sensible y específico de carcinomas serosos de ovario y carcinoma ductal infiltrante de mama, 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: Eliminación de células CHO transfectadas con Ovr110 por 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 de saporina con Mab-zap de cabra anti-IgG de ratón (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) y midiendo la viabilidad celular a 72 y 96 h, para detectar efectos de eliminación 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 (Corning), 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 elaboraron placas duplicadas para permitir lecturas a 72 h y 96 h. El día 2 (0 h), se añadieron 25 ul de concentraciones finales de MAb solo 4x o 25 ul de MAb 4x premezclados con 25 ul de Mab Zap 4x, o 25 ul de Mab Zap solo 4x, o 25 ul de medio solo a los pocillos de las placas de 96 pocillos, por triplicado, hasta un volumen final de 100 ul. Las concentraciones finales de MAb 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 ug/ml. Los pocillos triplicados con medio solo, MAb solo (2 ug/ml solamente) y MAb Zap solo se usaron como controles negativos. Se usó MAb 5E9 anti-receptor de transferrina (ATCC, Manassas, VA) como MAb de control positivo para la eliminación. 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), se añadieron 10 ul de una solución madre de Azul de Alamar (Biosource International, Camarillo, CA) a los pocillos de la primera serie de placas y se incubaron a 37 °C, en CO₂ al 5 % durante 2-7 h. Después se analizaron las placas 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 solo.

Tabla 7: Eliminación de Ovr110-CHO por MAb contra Ovr110 y conjugado MAb Zap Saporina

Clon MAb	Porcentaje de Ovr110-CHO positivas con MAb (IF) *	Porcentaje de crecimiento comparado con pocillos con medio solo					
		MAb contra Ovr110-CHO (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
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 detallada 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 puede observarse, el MAb Zap solo dio produjo 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 solo, las cuales produjeron un 0-10 % de inhibición del crecimiento (datos no mostrados). Sin embargo, ninguno de los MAb Ovr110 solo, produjo más del 3,8 % de inhibición del crecimiento de células Ovr110-CHO. Mientras que, cuando se añadió con conjugado MAb Zap saporina, todos los MAb contra Ovr110 ensayados produjeron más del 10 % más de inhibición del crecimiento que con MAb Zap solo. Ovr110.A57.1 en particular, a concentraciones de 0,08, 0,4 y 2,0 ug/ml, junto con MAb Zap produjo un 15,4-21,1 % más de inhibición del crecimiento de células Ovr110-CHO, que MAb Zap solo y un 57,7-63,4 % de inhibición del crecimiento en comparación con pocillos con medio solo. 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 contra Ovr110 anteriores serían adecuados para dirigir fármacos o isótopos a células tumorales in vivo.

Ejemplo 4: Unión de MAb contra 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. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 100: 10388-92 (2003)). Para verificar la unión de los MAb contra Ovr110 de la presente invención a células activadas, se purificaron células T humanas frescas y se estimularon con diferentes compuestos, como se analiza infra. Se analizó la unión de los MAb contra Ovr110 a células T CD3 positivas activadas que expresan CD25 (IL-2R) y CD71 (TFR) por FACS. Se examinó la afirmación de que BTLA es 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), así como la unión de la fusión BTLA humano-Fc de IgG2a de ratón desvelada en el presente documento a estas células T activadas y células tumorales.

Preparación de leucocitos de sangre periférica humana (PBL)

Se obtuvo sangre periférica humana de hombres donantes normales procedente de donantes voluntarios en el Stanford Blood Center (Palo Alto, CA). Se aislaron las células mononucleares usando procedimientos convencionales de centrifugación en gradiente de densidad de etapa única de Ficoll/Hypaque (1,077 g/ml).

Activación de células T

Se cultivaron células mononucleares a una concentración final de 10^6 /ml durante 3 días, a 37 °C, en RPMI-16 40 (CellGro), suplementado con FCS al 10 % (Hyclone, Utah), con fitohemaglutinina (PHA-M) (Sigma, St. Louis, MO) a 10 ug/ml o lipopolisacárido (LPS) (Sigma) a 10 ug/ml o una combinación de acetato forbol mirístico (PMA) (Sigma) a 10 ng/ml e ionomicina (Sigma) a 1 uM, en matraces de cultivo tisular convencionales de 25 cm² en CO₂ al 10 %.

Inmunofluorescencia y citometría de flujo

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 Fc. Se añadió anticuerpo FITC anti-CD3 (Serotec, Raleigh, NC) a cada pocillo y se añadieron CD80PE, CD86PE, CD25PE o anti-CD71 biotinilado (Serotec), Ovr110.A57.1 u Ovr110.C3.2 como MAb secundarios, 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 anticuerpo de burro anti-ratón PE (1 ug/ml) a las muestras y después se lavaron las células dos veces y se incubaron en suero de ratón para bloquear los sitios de unión libres en el anticuerpo de burro anti-ratón. Después se añadió anticuerpo FITC anti-CD3 como última etapa para identificar las células T. Después de lavar dos veces, las células se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron por citometría de flujo. La línea celular tumoral humana SKBR3 se incubó con MAb o BTLA-Fc como se ha descrito previamente con anterioridad.

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).

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	MFI*	% de células	MFI	% de células	MFI	% de células	MFI
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
* Media de la intensidad de la fluorescencia								

Tabla 8B: Unión de MAb anti-Ovr110 a células T activadas con PHA de hombres donantes normales

	N	% de células positivas el día 0 (promedio + desv. tip.)	N	% de células positivas el día 3 (promedio + desv. tip.)
Control neg.	5	1,8 + 1,4	6	1,9 + 0,4
CD3+ total	5	82,6 + 14,1	6	92,4 + 6,4
Porcentaje de células positivas abiertas en CD3				
Ovr110.A57.1 +	5	2,8 + 1,7	6	57 + 34,0
Ovr110.C3.2+	3	3,2 + 2,6	5	8,8 + 12,4
CD80+	5	1,2 + 0,8	6	3,6 + 3,1
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

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

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 aumentada ~2 veces pasadas 0 h						
* Intensidad de fluorescencia aumentada 4 veces pasadas 0 h						

Como puede observarse 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 la fluorescencia media de PE) en las células T activadas con PHA (abiertas en CD3), en comparación con células T no estimuladas. Se consiguió un aumento en la expresión de CD71 (es decir, aumento en células positivas o intensidad de fluorescencia) en las células dendríticas activadas (abiertas en CD1c) y monocitos activados. Estos datos demuestran la 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 algo aumentado en monocitos activados.

Para evaluar si BTLA es el receptor 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, puede observarse que la proteína de fusión BTLA-Fc se unió algo a las células Ovr110-293F (17 % de células positivas, MFI 24,57), pero no a las células 293F de control (2 % de células positivas, MFI 3,44). Además, no se observó unión apreciable de la IgG2a de ratón a células Ovr110-293F mediante el fragmento Fc (3 % de células positivas, MFI 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, puede concluirse que puede existir una relación entre la expresión de Ovr110 y la unión de BTLA a células que expresan Ovr110. BTLA puede ser el receptor de Ovr110, o la expresión de Ovr110 puede facilitar la unión de BTLA mediante formación de complejos, señalización u otros procesos celulares. Independientemente, es evidente que estas dos proteínas pueden ser útiles como agentes de diagnóstico o terapéuticos, bloqueando la función tumoral. Además, también podrían usarse versiones modificadas de BTLA-Fc y Ovr110-Fc conjugadas con, por ejemplo, un componente citotóxico o citostático, u otra funcionalidad, como agente terapéutico.

Los datos presentados en Tablas 8A y 8B, demuestran que el MAb A57.1 se une preferentemente a las células T activadas y el MAb C3.2 se une preferentemente a la línea celular tumoral SKBR3. Estos datos sugieren que hay diferentes epítopes presentes en Ovr110 en células T y Ovr110 en células tumorales. Esto es ventajoso para unir Ovr110 en células tumorales y disminuir los efectos inmunosupresores de Ovr110 expresado en o desprendido de tumores, minimizando al mismo tiempo cualquier efecto inmunosupresor causado por la unión de Ovr110 en células T. Anticuerpos tales como Ovr110.C3.2 o anticuerpos que se unan al epítipo unido por C3.2 son útiles como anticuerpo anti-tumoral terapéutico.

Ejemplo 5: Validación funcional de Ovr110

Materiales y procedimientos

Células y cultivo celular

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

Transferencias de Western

La Figura 8A muestra la detección por transferencia de Western de la proteína Ovr110 con mAb A57.1 en las líneas celulares demostrando una correlación de la expresión de ARNm con la expresión de proteína. La Figura 8B es una transferencia de Western que muestra la detección de la proteína Ovr110 en las líneas celulares y muestras tisulares de tumor de ovario humano pero no en tejido adyacente normal (NAT). La Figura 8B es una transferencia de Western que muestra la detección de la proteína Ovr110 en las líneas celulares y muestras tisulares de tumor de mama humano pero no en tejido adyacente normal (NAT). Además, La Figura 9 es una transferencia de Western que muestra que la proteína Ovr110 no se detecta en extractos de órganos principales, lo que indica que estrategias

terapéuticas dirigidas contra Ovr110 no tienen probabilidad de interferir con la función de órganos principales o críticos.

Diseño y preparación de oligonucleótidos ARNip

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

Anti-Ovr110 N° 37: con sentido 5'-GGUGUUUUAGGCUUGGUCC-3' (MEJOR) (SEC ID N° 14)

Anti-Ovr110 N° 39: con sentido 5'-CUCACAGAUGCUGGCACCU-3' (SEC ID N° 15)

Anti-Ovr110 N° 41: con sentido 5'-GGUUGUGUCUGUGCUCUAC-3' (SEC ID N° 16)

Anti-Emerina: con sentido 5'-CCGUGCUCUGGGGCGUGG-3' (SEC ID N° 17)

Desorganizado: con sentido 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3' (SEC ID N° 18)

Anti-DAXX: con sentido 5'-GGAGUUGGAUCUCUCAGAA-3' (SEC ID N° 19)

Transfección con oligonucleótidos ARNip

Se sembraron 6 x 10⁴ células SKBR3 en placas de 12 pocillos durante 18-24 horas antes de la transfección. La transfección transitoria se realizó usando el reactivo oligofectamina (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usó una concentración final de ARNip 100 nM (excepto ARNip de DAXX que fue 200 nM) y se usaron 1,5 ul de oligofectamina por pocillo de células. Los ARNip se transfectaron por triplicado para todos los experimentos. Se evaluaron pocillos paralelos de células 72 horas después de la transfección para cambios en los niveles de ARNm por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (QPCR), cambios en los niveles de proteína por inmunotransferencia de Western y cambios en la apoptosis por dos sistemas de ensayo diferentes (véase a continuación). La Figura 10A demuestra que los ARNip de Ovr110 son específicos para el transcrito de Ovr110 y no silencian GAPDH medido por QPCR. La Figura 10B demuestra que el ARNip de Ovr110 reduce la expresión del mensaje de Ovr110 en comparación con controles de ARNip ausente o desorganizado. Los resultados que muestran la regulación negativa de la proteína Ovr110 se muestran en la Figura 11. El ARNip N° 37 contra Ovr110 también se ensayó con células que no expresaban Ovr110 y no hubo efecto sobre la apoptosis (datos no mostrados). Todos los hallazgos se confirmaron con al menos 2 experimentos adicionales.

RT-PCR cuantitativa a tiempo real (QPCR)

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

Ensayos de apoptosis

Se usaron dos kits de ensayo diferentes para evaluar los efectos del ARNip 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 se midió la actividad caspasa, reflejada como una lectura de fluorescencia, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Con el segundo kit, "Guava Nexin V-PE Kit" (Guava Technologies Inc.), las células tratadas se recogieron por tratamiento con tripsina y se lavaron y se resuspendieron aproximadamente 10⁵ células en 40 ul del tampón proporcionado y se añadieron 5 ul de Anexina V (+) y 7-AAD (-). Después de 20 minutos de incubación en hielo, se analizaron las células usando el citómetro de flujo Guava PCA 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 la Figura 13.

Para los ensayos de anoikis, se trataron con tripsina células IEC-18 y RK3E que expresaban los genes indicados y se resuspendieron en medio sin FBS a una densidad de 150.000 y 200.000 células/ml, respectivamente. Se sembró una alícuota de 1 ml de la mezcla 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 se evaluaron usando el kit Guava-Nexin V-PE como anteriormente. Ras, un oncogén potente, sirvió como control positivo y AP como control negativo para el ensayo de anoikis. Los resultados se muestran en la Figura 15.

SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia de Western

Tras 72 h desde la transfección con ARNip, se prepararon extractos celulares 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 un modo similar. Se prepararon extractos proteicos de tumores recogidos por homogeneización de tejido tumoral picado y congelado 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 microfuga para aclarar los extractos. Se usaron entre 20 y 50 µg de extracto proteico para cada carril de gel; se evaluaron concentraciones equivalentes de proteína para comparaciones de nivel de proteínas en el mismo gel. Los extractos aclarados se mezclaron con un volumen igual de tampón de muestra de Laemmli concentrado 2x (Invitrogen), se calentaron a 70 °C durante 10 minutos y después se analizaron usando minigeles de SDS-poliacrilamida al 4-12 % vertidos previamente (Nupage, Invitrogen) con tampón de procesamiento MES (Nupage; Invitrogen). Los geles se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (tamaño de poro de 0,45 µm, Invitrogen) usando tampón de transferencia Nupage 1X más metanol al 10 %. Las membranas se aclararon 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 %. Se produjo un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra Ovr110 usando proteína Ovr110 recombinante. El anticuerpo monoclonal contra Ovr110 se usó a una concentración final de 1 µg/ml y un anticuerpo monoclonal de ratón contra GADPH (Chemicon Inc.) a una concentración final de 2 µg/ml. Tras la incubación del 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 anticuerpo de cabra anti-inmoglobulina de ratón ligado a peroxidasa de rábano rusticano (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 potenciada (ECL) según las directrices del fabricante (Amersham).

Construcción de vectores de expresión

Para la expresión de la proteína Ovr110 en células de mamífero, se subclonó el ADNc de Ovr110 en el vector pLXSN (BD Bioscience/Clontech) y se verificó la secuencia. El vector retroviral pLXSN utiliza la 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 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, se sembraron las células 293T a una densidad de 8×10^5 células por pocillo de una placa de 6 pocillos en placas recubiertas con colágeno Biocoat (BD). Las células se transfectaron con ADN plasmídico purificado usando lipofectamina con la adición de reactivo PLUS (Invitrogen). Por cada pocillo de células se añadieron 0,8 µg de ADN plasmídico del virus: pLXSN-Ovr110, pLXSN-Ovr110HA o pLXSN-AP más 0,8 µg de pVpack-ECO y 0,8 µg de pVpackGP (Stratagene) a una solución madre de 125 µl de DMEM sin suero y 10 µl de reactivo PLUS seguido por incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 8 µl de lipofectamina diluida en 125 µl de medio DMEM a la mezcla de reactivo ADN/PLUS y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió un ml de DMEM a la mezcla final de lipofectamina/ADN y se aplicó a la monocapa de células, que ya contenía 1 ml de DMEM sin suero, seguido de 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 suplementado con FBS al 10 % + 100 U/ml de Pen/Estrep para la recogida del virus. El medio que contenía virus se recogió 24 horas después y se filtró a través de un filtro polisulfónico de 0,45 µm. Para el empaquetamiento del virus anfitriónico se siguió el mismo procedimiento excepto 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 fresco que contenía virus a una concentración final de 4 µg/ml. Las 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 incubaron durante 3 horas en una incubadora a 37 °C humidificada con CO₂ al 5 % con formación de remolinos ocasional. El medio que contenía virus se reemplazó por medio de cultivo fresco y las células se incubaron a 37 °C durante 60-72 horas, punto en el cual se incluyó una concentración final de 350 µg/ml de sulfato de G418 (Cellgro) en el medio de cultivo para seleccionar células infectadas por el virus. Las células se mantuvieron entre el 70-80 % de confluencia y el medio que contenía G418 se cambió cada 2 días. Tras la selección con G418, se usaron combinaciones de células para experimentos posteriores incluyendo la verificación de la expresión de la proteína Ovr110 por análisis de inmunotransferencia de Western en que se extrajeron las células y se analizaron como se ha descrito

anteriormente. La expresión de AP por monocapas de células infectadas se controló por 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 aclararon con PBS, se calentaron a 65 °C durante 30 minutos y se visualizó AP por incubación con el sustrato líquido BCIP/NBT (Sigma) durante 2-3 horas.

5 Experimentos de xenoinjerto tumoral

Se inyectaron combinaciones de células SKOV3 seleccionadas con G418 e infectadas con retrovirus que expresaban AP u Ovr110 se inyectaron por vía subcutánea en ratones desnudos. Las células SKOV3 precursoras también se usaron para comparación. Se implantaron 10^7 de cada tipo celular con matrigel en cada uno de 6 ratones. El 100 % de los ratones inyectados con células tumorales desarrollaron tumores y la formación del tumor se controló por palpación y medición con calibre cuando era posible cada 4 días mientras duró el estudio. Los resultados se muestran en la Figura 14. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor del grupo en el tiempo.

Ejemplo 6: Detección de Ovr110 por ELISA tipo sándwich monoclonal

Se recubrieron placas de poliestireno de elevada unión (Coming Life Sciences (MA)) durante una noche a 4 °C con 0,8 µg/pocillo de MAb anti-Ovr110. La solución de recubrimiento se retiró por aspiración y se bloquearon los sitios de unión libres 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 de ternera 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 de damero, cada par se ensayó en 50 ng/ml y 0 ng/ml de Ovr110 de mamífero recombinante (parte extracelular). Para cada ELISA tipo sándwich, se procesaron patrones de 10, 2,5, 0,5, 0,25, 0,1 y 0 ng/ml de Ovr110 en paralelo con las muestras de ensayo. Los patrones y las muestras 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 de lavar, se añadieron 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano rusticano (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 de lavar, la placa se reveló 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 tipo damero, se ensayaron todas las posibles combinaciones de anticuerpos para la eficacia como reactivos de recubrimiento 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 ELISA tipo sándwich para analizar la eficacia de la detección de Ovr110 endógeno en lisados de líneas celulares cancerosas y fluidos corporales. Se usó el par A72.1/A7.1 para ensayar las 2700 muestras séricas enumeradas a continuación.

Resultados

Los resultados del ELISA tipo damero 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 recubrimiento como de detección en todas las posibles combinaciones. Todos los pares se ensayaron por duplicado con 100 ng de proteína Ovr110B recombinante en tampón, con tampón solo como blanco. Los resultados se muestran como la proporción señal/ruido específica. Los MAb detectan dos epítopes distintos, en base a estos datos de emparejamiento. Los MAb Ovr110 A7, A77, A87 y A10 reaccionan con un epítipo o epítipes que están lo suficientemente cerca para impedir estéricamente la unión de los otros tres MAb. Todos los anticuerpos de la serie C detectan también este epítipo (o epítipes solapantes). El otro epítipo o epítipes distintos se detectan por los MAb Ovr110 A89, A57, A31, A72, A107. Se usaron varios pares con la proporción señal/ruido más elevada para ensayar la sensibilidad por la proteína recombinante, la reactividad hacia la proteína nativa en líneas celulares y algunas muestras de suero inicial.

45 Especificidades de epítipo – Unión de MAb y mapeo de epítipes

Tabla 9A: Emparejamiento de MAb de la serie A contra Ovr110 por ELISA tipo sándwich

MAb de detección	A7	A10	A13	A22	A31	A57	A77	A87	A89	A107
MAb de recubrimiento										
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 la serie C contra Ovr110 por ELISA tipo sándwich

MAb de detección	C3.2	C5.1	C5.3	C7	C9	C11	C12	C17	A72	A7.1	A57.1	A77.1
MAb de recubrimiento												
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	33	5	1	24	3	1	18	1	3
A57	12	8	10	33	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

El mapa de epítopes de los MAb contra Ovr110 obtenido de los resultados de estas tablas se muestra en la Figura 16.

Muestras séricas humanas

Las muestras séricas cancerosas y benignas humanas se obtuvieron de IMPATH-BCP, Inc y DSS (Diagnostic Support Service). Las muestras séricas de mujeres sanas se obtuvieron de ProMedex, LCC. Todas las muestras se formaron en alícuotas tras su llegada y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Resultados

Como se ha descrito anteriormente, para la detección de Ovr110 en muestras séricas, se usó un sistema de detección sensible basado en el uso de peroxidada de rábano rusticano (HRP) y un sustrato TMB de alta sensibilidad (DAKO). La dosis detectable mínima (MDD) para Ovr110 en este formato ELISA es 100 pg/ml. Para el cálculo de los valores medios, las muestras con valores por debajo de la MDD se definieron como 100 pg/ml de Ovr110. La dosis detectable mínima se define como dos abreviaturas convencionales por encima de la señal de fondo. La mayoría de las muestras séricas de pacientes sanos mostraron bajas concentraciones de Ovr110 en el ELISA tipo sándwich mientras que los sueros de pacientes con cáncer de ovario tenían elevados niveles de Ovr110.

Se ensayó la concentración de Ovr110 en más de 2700 muestras séricas de pacientes con cáncer pulmonar, de mama, de colon, de próstata o de ovario o con enfermedades benignas no cancerosas. Para una lista completa de todas las muestras ensayadas, véase la siguiente Tabla 10.

Tabla 10: Muestras séricas ensayadas por ELISA tipo sándwich

Tipo de muestra	Nº de muestras
Normal	555 (281-M, 274-F)
Cáncer de mama	260
Benigna de mama	180
Cáncer de colon	150 (71-M, 79-F)
Benigna de colon	296 (151-M, 145-F)
Cáncer pulmonar	323 (235-M, 93-F)
Benigna pulmonar	250 (130-M, 120-F)
Cáncer de ovario	236
Benigna de ovario	150
Cáncer de próstata	138
Benigna de próstata	147

La Figura 17 muestra la concentración de Ovr110 en suero de 540 donantes sanos y más de 1200 pacientes con cáncer. Se observan niveles elevados de Ovr110 en algunos pacientes de todos los tipos de cáncer pero las

Se ensayó la concentración de Ovr110 en suero de ciento cuarenta y siete mujeres con cáncer seroso o endometrial de ovario y sesenta y siete sueros de mujeres con cáncer mucinoso, usando sueros que representan las cuatro fases de progreso tumoral. Como se muestra en la Figura 18, los dos primeros tipos de cáncer de ovario son positivos para Ovr110 por IHC mientras que el cáncer mucinoso no. En buena concordancia con estos datos, la

Cuando se compara con mujeres sanas, la concentración media de Ovr110 en cáncer seroso y endometrial es más de 2 veces mayor. La mayoría de las mujeres en este grupo de 260 mujeres sanas están por encima de los 50 años de edad para reflejar la distribución de edad de las mujeres con cáncer de ovario. No podemos observar diferencias en la detección de Ovr110 en mujeres sanas de edad pre-menopáusica y post-menopáusica. Más importante, tampoco podemos detectar un nivel elevado de Ovr110 en sueros de ciento cincuenta mujeres con enfermedades benignas de ovario (50 sueros de pacientes con endometriosis, ovarios agrandados y ovarios poliquísticos, respectivamente). La Figura 19A resumen los hallazgos del ELISA sobre suero Ovr110 como una curva Característica Operativa del Receptor (ROC) para todos los cánceres de ovario con un área bajo la curva (AOC) de 0,78. Además, la Figura 19B es una curva ROC que demuestra la utilidad específica del ELISA de Ovr110 para detectar cáncer seroso de ovario como se indica por la elevada AOC de 0,8.

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

Ejemplo 7: Mapeo de epítopes de Ovr110

Los epítopes reconocidos por un panel de anticuerpos de la serie A, C e I se determinaron explorando péptidos solapantes para la reactividad con los anticuerpos a través de un ensayo basado en ELISA. Se solicitaron veinticuatro péptidos solapantes en SynPep (Dublin, CA). Los péptidos 1-23 eran de 15 unidades y el péptido 24 contenía 8 aminoácidos. Las secuencias peptídicas comenzaban en el aminoácido G21 en el extremo N-terminal y finalizaban en A258 en el extremo C-terminal de la proteína Ovr110. Estos péptidos abarcan la región extracelular de la proteína Ovr110 madura desde el final de la secuencia señal del péptido hasta el inicio del dominio transmembrana. Véase la Figura 20. Los péptidos se proporcionaron en pequeñas alícuotas con un intervalo de 1-3 mg como solución madre. Se preparó una dilución 1:400 en PBS de cada péptido y se añadieron 50 µl a cada pocillo por duplicado en placas 4X Costar de 96 pocillos (Nº 3690) (Costar Corporation; Cambridge, MA) y se dejaron durante una noche. Se usó la proteína de longitud completa Ovr110 de mamífero con marca his descrita anteriormente como control positivo en cada placa de 96 pocillos. El siguiente día, las placas se secaron por golpeo y se bloquearon con TBST BSA al 0,5 % durante aproximadamente 40 minutos. Se añadieron anticuerpos

anti-Ovr110 (50 µl) a 20 µg/ml por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado TBST. El conjugado secundario, anticuerpo de cabra anti-Fc de Ig de ratón-AP (Pierce, Rockford, IL) se diluyó 1:5000 en una solución de TBST/BSA y se añadieron 50 µl a cada pocillo. Las placas se agitaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces antes de añadir 50 µl de sustrato a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sustrato usado fue pNPP en 1xDEA (1 mg/ml). Para visualizar el ensayo, las placas se leyeron a 405 nm en un SpectraMaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando el software Softmax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y Excel (Microsoft; Seattle, WA) para el análisis.

La siguiente Tabla 11 resume los resultados del experimento de unión peptídica de anticuerpos anti-Ovr110 descrito anteriormente. Los anticuerpos anti-Ovr110 de la serie A, C e I mostraron una fuerte reactividad específica con los péptidos 8, 13, 15 y 16 de Ovr110. Tres anticuerpos I2, I3, e I4, mostraron fuerte reactividad al péptido 8 y el anticuerpo C9.1 fue fuertemente reactivo a péptidos 16. Cuatro anticuerpos, C7.1, C12.1, C16.1 e I20, no reconocieron ningún péptido, pero se unían a la proteína de longitud completa y a células transfectadas que expresaban Ovr110, como se ha mostrado anteriormente, lo que indica que reconocen la conformación en lugar del epítipo lineal de Ovr110.

El resto de los anticuerpos ensayados reaccionaron con cualquier péptido 13 ó 15 o ambos. Por ejemplo, los anticuerpos A57.1, A72.1, C10.1, C11.1, I11 reaccionaron fuertemente con el péptido 13. Los anticuerpos A7.1, C3.2 y C6.3 se unieron únicamente al péptido 15. Los anticuerpos A87.1, C5.3.1 y C 17.1 mostraron un nuevo patrón de unión porque se unieron a ambos péptidos 13 y 15, aunque la reactividad al péptido 15 fue mayor que la reactividad al péptido 13.

Usando software disponible al público, se predijeron las modificaciones post-traduccionales para la proteína Ovr110 completa y se mapeo cada característica en el péptido respectivo.

Tabla 11

Número de péptido	Secuencia peptídica	SEC ID N°	Ab que se unen al péptido	Sitios de modificación post-traduccional en el péptido predichos por Ovr110
1	GAIALIIGFGISGRH	20		SgR-PKC fosforilación
2	ISGRHSITVTTVASA	21		
3	TVASAGNIGEDGIQS	22		
4	DGIQSCTFEPDIKLS	23		GlqsCT-N-miristoilación
5	DIKLSDIVIQWLKEG	24		
6	WLKEGVLGLVHEFKE	25		
7	HEFKEGKDELSEQDE	26		SeqD-CK2 fosforilación
8	SEQDEMFRGRTAVFA	27	I2, I3, I4	
9	TAVFADQVIVGNASL	28		NASL-N-Glucosilación
10	GNASLRLKNVQLTDA	29		SIR- PKC fosforilación; NASL-N-Glucosilación
11	QLTDAGTYKCYIITS	30		TyK-PKC fosforilación; GTyKCy-N-miristoilación
12	YIITSKGKGANLEY	31		Tsk-PKC fosforilación
13	ANLEYKTGAFSMPEV	32	A57.1, A72.1, A87.1, C5.3.1, C10.1, C11.1, C17.1, 111	smpE-CK2 fosforilación
14	SMPEVNVVDYNASSET	33		mpevndYnasset-

				sulfatación de tirosina; NASS-N-glucosilación
15	ASSETLRCEAPRWFP	34	A7.1, A87.1, C3.2, C5.3.1, C6.3, C17.1	TIR-PKC fosforilación
16	PRWFPQPTWWASQV	35	C9.1	
17	WASQVDQGANFSEVS	36		NFSE-N-Glucosilación; SqvD-CK2 fosforilación; GAnfSE-N-miristoilación
18	FSEVSNTSFELNSEN	37		NTSF-N-Glucosilación; TsfE-CK2 fosforilación
19	LNSENVMTKVVSVLY	38		NVTM-N-Glucosilación; TMK-PKC fosforilación
20	VSVLYNVTINNTYSC	39		NVTI y NNTY-N- Glucosilación
21	NTYSCMIENDIAKAT	40		
22	IAKATGDIKVTESEI	41		TesE-CK2 fosforilación
23	TESEIKRRSHLQLLN	42		KRRS-AMPC y GMPc-dep fosforilación de proteína quinasa
24	LQLLNSKA	43		
	sin respuesta anti-péptido		C7.1, C12.1, C16.1, 120	

Como se muestra en la Figura 20, la región de la proteína Ovr110 en *cursiva* representa los sitios donde la mayoría de los anticuerpos de la serie A, C e I se unen a epítopos en Ovr110. Esta región solapa con las regiones IgV (subrayada) e IgC (doble subrayado) de la proteína Ovr110. De forma interesante, la mayoría de los anticuerpos A, C e I se unen a los péptidos 13 y 15 donde existen sitios predichos para CK2 fosforilación, sulfatación de tirosina, N-glucosilación y PKC fosforilación (véase la Tabla 11 anterior). Esta secuencia también está en el área donde la región IgV se separa de la región IgC.

Como se ha indicado anteriormente, estas regiones peptídicas parecen tener elevada inmunogenicidad y por tanto deben ser parte de la proteína Ovr110 que tiene un elevado grado de exposición sobre la superficie celular. La siguiente Tabla 12 proporciona evidencias adicionales para esta predicción ya que la mayoría de los anticuerpos (A7.1, A87.1, C3.2, C5.3.1, y C6.3) que se unen fuertemente al péptido 15 por el ensayo ELISA anterior también muestra unión significativa sobre la superficie celular de la línea celular tumoral de mama, SKBr3. Los anticuerpos monoclonales anti-Ovr110 A57.1 e I20 son únicos porque se unen a Ovr110 sobre células T activadas pero no muestran unión significativa a Ovr110 sobre células SKBr3.

Tabla 12

Anticuerpo	Especificidad de péptido Ovr110	Reconocimiento de la proteína nativa en células T	Reconocimiento de la proteína nativa en células tumorales SKBr3
A7.1	débil anti-15	NS	elevado
A57.1	fuerte anti-13	elevado	NS
A72.1	fuerte anti-13	NS	NS
A87.1	fuerte anti-15 y 13	NS	moderado
C3.2	fuerte anti-15	NS	elevado
C5.3.1	fuerte anti-15, moderada anti-13	NS	moderado
C6.3	fuerte anti-15	NS	elevado

C7.1	sin respuesta anti-péptido	NT	NT
C9.1	fuerte anti-16	NS	NS
C10.1	fuerte anti-13	NT	NS
C11.1	fuerte anti-13	NS	NS
C12.1	sin respuesta anti-péptido	NS	NS
C16.1	sin respuesta anti-péptido	NS	NS
C17.1	fuerte anti-15, moderada anti-13	NS	bajo
I2	fuerte anti-8	NS	NS
I3	fuerte anti-8	NS	NS
I4	fuerte anti-8	NS	NS
I11	fuerte anti-13	NS	NS
I20	sin respuesta anti-péptido	bajo	NS
Elevado 75-95 % Moderado 45-74 % Bajo 15-44 % NS No significativo NT No ensayado			

Publicaciones previas han mostrado la estructura terciaria conservada entre las proteínas de la familia B7, a pesar de tener pocos restos conservados. Sica, *supra*. Se cree que estos restos conservados son de mayor importancia para la estructura de los miembros de la familia que para la actividad o el reconocimiento del receptor para la unión. Se realizó una alineación de las proteínas miembros de la familia B7 human B7.1 (acceso a Refseq: NP_005182), B7.2 (acceso a Refseq: NP_787058) y Ovr110 usando el software disponible al público ClustalW Versión 1.83 usando el ajuste por defecto. Véase la Figura 21. La visualización de la alineación de las proteínas de la familia B7 junto con un modelo tridimensional disponible al público para B7.1 (PDB ID: 1DR9) demostró la localización de los restos conservados. Entonces fue posible determinar si las regiones análogas de los péptidos Ovr110 estaban localizadas en el modelo tridimensional de B7.1. Los hallazgos indicaron que había restos expuestos en los péptidos 13 y 15 sobre la superficie de Ovr110 y por lo tanto están fácilmente accesibles y son inmunogénicos. Este análisis apoya el hallazgo de que muchos anticuerpos generados contra la proteína Ovr110 muestran reactividad específica al péptido 13, 15 o ambos. Además, en base a la alineación anterior y el modelo tridimensional para B7.1 se anticipa que anticuerpos que se unen a la región IgV de Ovr110 (restos N47-F150, véase la Figura 20) inhibirán la unión de Ovr110 al receptor de Ovr110. Específicamente, se anticipa que anticuerpos que se unen al péptido 12 (SEC ID N° 31) o a un epítopo conformacional que incluya restos en el péptido 12 inhibirán la unión de Ovr110 a su receptor.

La Figura 22 es una alineación de Ovr110 y homólogos de Ovr110 de ratón (acceso a Refseq: NP_848709), rata (acceso a Refseq: XP_227553) y xenopus (acceso a Genbank: AAH44000). La alineación se realizó usando el software disponible al público ClustalW 1.83 usando el ajuste por defecto. Como el homólogo de Ovr110 de ratón sería inmunogénico en ratones, diferencias entre Ovr110 human y el homólogo de ratón probablemente son responsables de la respuesta inmune y por tanto de los anticuerpos. Los péptidos solapantes analizados junto con la alineación de homólogos de Ovr110 de especie cruzada y la estructura tridimensional conservada entre Ovr110 y los miembros B7.1 y B7.2 de la familia (véase Sica, *supra*.) permitió determinar con mayor precisión los epítopos reconocidos por los anticuerpos de la serie A, C, e I.

Como se ha mostrado anteriormente, los anticuerpos I2, I3, e I4 se unen al péptido 8 y las únicas diferencias significativas entre las secuencias de ratón y humanas en esta región están entre los aminoácidos 91 a 94 (SEQD en seres humanos en comparación con SQQH en ratón), donde se han remplazado la glutamina (Q) y la histidina (H) por ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D), respectivamente. Por lo tanto, se concluye que I2, I3 y I4 probablemente son específicos para un epítopo generado por la secuencia SEQD (SEC ID N° 44).

Los anticuerpos A57.1, A72.1, C10.1, C11.1, C17.1 e I11 son fuertemente reactivos al péptido 13 pero no a los péptidos 14 ó 15. El cambio de secuencia de aminoácidos entre ratón a ser humano sucede en la posición 155 donde se ha remplazado la isoleucina (I) por valina (V) (SMPEI a SMPEV), por lo tanto se puede concluir que estos anticuerpos probablemente son específicos para un epítopo generado por la secuencia SMPEV (SEC ID N° 45).

Los anticuerpos A7.1, C3.2 y C6.3 son anticuerpos que se unen únicamente al péptido 15. En la comparación de la secuencia de aminoácidos de ratón y ser humano en esta región (SESLR y SETLR, respectivamente), la serina en la posición 165 se ha remplazado por una treonina. Por lo tanto, se puede concluir que estos anticuerpos reconocen la treonina en el péptido 15 o la proteína nativa de longitud completa y por tanto, pueden bloquear cualquier unión prospectiva a o la fosforilación del sitio de PKC fosforilación que se predice por la secuencia TLR en SETLR (SEC ID N° 46).

Los anticuerpos A87.1, C5.3.1 y C17.1, como se ha mencionado anteriormente, tienen un patrón de unión único entre estas series de anticuerpos. Estos anticuerpos se unen a los péptidos 15 y 13 pero con unión más fuerte al péptido 15 que al péptido 13. Como no existe reactividad a péptido 14, esto sugiere que estos anticuerpos son específicos para un resto común a ambos péptidos 13 y 15, de los cuales hay uno, la treonina. Los anticuerpos A87.1, C5.3.1 y C17.1 difieren de A7.1, C3.2 y C6.3 en que también se unen al péptido 13 mientras que los últimos 3 anticuerpos no. Esto sugiere que los péptidos 13 y 15 discurren en cadenas paralelas en la estructura proteica tridimensional de Ovr110 como se predice con las regiones homólogas dentro del miembro B7.1 de la familia Ovr110. Los anticuerpos A87.1, C5.3.1, y C17.1 son suficientemente grandes para combinar ambas cadenas con sus dominios F(ab), y por tanto reaccionan con ambas cadenas al mismo tiempo. La reactividad más fuerte al péptido 15, sin embargo, indica que el resto de treonina en el péptido trece está en una orientación diferente, haciendo que le sea más difícil unirse. Por lo tanto, los anticuerpos A7.1, C3.2 y C6.3 deben reconocer cada uno la treonina en una orientación conformacional diferente o deben reconocer más de un resto de treonina, como se ha sugerido anteriormente.

El anticuerpo C9.1 es el único anticuerpo que reconoce el péptido 16. En esta región, la posición 180 es alanina (A) en ratón y valina (V) en ser humano. Por lo tanto, se concluye que el anticuerpo C9.1 probablemente es específico para un epítope generado por la secuencia TVVW (SEC ID N° 47).

Ejemplo 8: Experimento funcional de proliferación de células T Ovr110

En base a la unión de los anticuerpos anti-Ovr110 de las serie A, C e I a los péptidos 13 y 15, se contempla que estos sitios son importantes en la protección del sistema inmune, especialmente con respecto al mantenimiento de la actividad de las células T. La Figura 23 es un gráfico simplificado que representa la complejidad de la activación de las células T. La activación de una célula T requiere la interacción de varias proteínas de superficie de células T con ligandos específicos que pueden hallarse en células presentadoras de antígeno (APC) tales como células B o células dendríticas.

Lo primero y principal, el receptor de células T (TCR) debe acoplar un péptido antigénico en el contexto de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Aunque esta señal TCR-péptido/MHC es necesaria para la activación de la célula T, también se requiere una segunda señal que se conoce como señal coestimuladora. Esta señal se genera por otra serie de moléculas de superficie celular llamadas CD28 y sus ligandos, B7.1 y B7.2. La proliferación de células T se potencia a través de la interacción de CD28 con B7.1 o B7.2 ya que esta interacción produce ARNm de IL-2 que provoca una producción aumentada de la citoquina IL-2. Por tanto, la producción de IL-2 puede usarse como medición directa de la activación y proliferación de células T. En claro contraste, cuando CTLA-4, un homólogo de CD28, se une a B7.1 o B7.2, la producción de IL-2 se reduce enormemente y provoca la restricción de la expansión de las células T.

Como se ha demostrado, Ovr110 se halla en tejido y células de cáncer de ovario y mama así como en células T activadas y otras células inmunes. Para determinar el efecto de anticuerpos anti-Ovr110 sobre células T humanas, se realizan ensayos de proliferación de IL-2 midiendo los niveles de producción de IL-2 por ELISA. En estos experimentos, se purifican las células T entre las células mononucleares de sangre periférica obtenidas de la sangre (hombres donantes, con edades de 35-55, Stanford University Blood Center) usando un kit de aislamiento de células T humanas adquirido en Miltenyi (Auburn, CA). Se adquieren hibridomas productores de OKT3 de la ATCC (Manassas, VA) y se aumentan en escala y se purifican internamente. Como las células T pueden activarse directamente estimulando la cadena ϵ de CD3, se recubren placas de 96 pocillos con 50 μ l de anticuerpo OKT3 (anti-CD3) a 3-5 μ g/ml en PBS durante una noche a 4 °C. Los pocillos se lavan 3 veces con PBS y se añaden 100 μ l de células T a 1,5-2x10⁶ células/ml a los pocillos. Se añaden anticuerpos anti-Ovr110 individuales, es decir A57.1 o I20 a las células T en volúmenes de 50 μ l y se determina el efecto de los anticuerpos midiendo la producción de IL-2 por las células T usando un kit ELISA (Roche, Emeryville, CA). Véase el esquema de la Figura 24. La reducción de la producción de IL-2 únicamente por la adición de anticuerpos anti-Ovr110 indica que anticuerpos que se unen específicamente a Ovr110 en células T o se unen al péptido 13 de Ovr110, tales como A57.1 o I20, son útiles para inhibir las células T y la actividad inmunológica de las células T. Estos resultados se representan como el escenario 1 en la Figura 24.

Estos anticuerpos anti-Ovr110 son de valor terapéutico para reducir las respuestas inmunes indeseadas como sucede en la mayoría de las enfermedades autoinmunes tales como: esclerosis múltiple, miastenia grave, neuropatías autoinmunes tales como Guillain-Barré, uveítis autoinmune, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciososa, trombocitopenia autoinmune, arteritis temporal, síndrome anti-fosfolipídico, vasculitis tales como granulomatosis de Wegener, enfermedad de Behcet, psoriasis, dermatitis herpetiforme, pénfigo vulgar, vitíligo, diabetes mellitus de tipo 1 o

mediada por el sistema inmune, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, ooforitis y orquitis autoinmune, enfermedad autoinmune de la glándula suprarrenal, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, esclerodermia, polimiositis, dermatomiositis, espondiloartropatías tales como espondilitis anquilosante y síndrome de Sjogren.

- Los anticuerpos anti-Ovr110 que reconocen células tumorales solas, tales como C3.2, A7.1, o C6.3 se usan en el ensayo de proliferación de IL-2 descrito anteriormente. La unión preferente de Ovr110 en células tumorales demuestra que el bloqueo del receptor de Ovr110 en la unión al ligando Ovr110 en la superficie de células tumorales permitirá que las células T permanezcan funcionales. El experimento se realiza como anteriormente, excepto en que además, se añaden células SKBr3 a los pocillos. Dado que SKBr3 expresa el ligando Ovr110 pero no el receptor (determinado por experimentos de tinción con la proteína de fusión Ovr110-Fc de Ig), puede determinarse el efecto de las células tumorales SKBr3 sobre células T activadas. Como SKBr3 expresa el ligando Ovr110 y las células T expresan el receptor que reconoce Ovr110, esta interacción provoca la inhibición de las células T. Véase Sica, *supra* y Prasad, *supra*. Sin embargo, la adición a los pocillos de anticuerpos anti-Ovr110 que se unen específicamente a Ovr110 en células tumorales, no afecta a las células T, medido por la producción continuada de IL-2. Estos resultados se representan como el escenario 2 en la Figura 24. Estos anticuerpos anti-Ovr110, tales como C3.2, A7.1, o C6.3, que se unen a Ovr110 en células tumorales pero no inhiben las respuestas inmunes, tienen gran valor terapéutico ya que puede dirigirse a los tumores o células tumorales de cánceres de mama, de ovario o pancreáticos sin regular negativamente el sistema inmune.

Ejemplo 9: Rendimiento del anticuerpo contra Ovr110 en experimentos funcionales de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

- Adicionalmente, los anticuerpos anti-Ovr110 específicos de tumor, tales como C3.2, A7.1, o C6.3, son capaces de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) usando células natural killer (NK) como células efectoras. Esto se demuestra marcando células SKBr3 con ^{51}Cr cromo durante una hora. El exceso de ^{51}Cr se retira por lavado y las células tumorales se preincuban con un anticuerpo anti-Ovr110 específico de tumor tal como C3.2 o C6.3, junto con anticuerpos de control positivo y negativo, a 2 $\mu\text{g/ml}$ durante 15-30 minutos. Las células natural killer se titulan en una placa de 96 pocillos en proporciones efector a diana que varían de 100:1 a 0,4415:1. Las células tumorales incubadas se añaden en una cantidad constante, 10.000 células por pocillo. Los pocillos que contienen células tumorales solas proporcionan el nivel de lisis espontánea. La lisis máxima posible se determina por la adición de Triton-X al 1 % diluido en PBS a una serie de células tumorales que no contienen ninguna célula efectora. Todos los pocillos se realizan por triplicado.
- Después de un periodo de incubación de 4 horas a 37 °C, las placas se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes (100 μl) se recogen y se leen en un contador gamma. La lisis específica se determina por la siguiente fórmula

$$(\text{Experimental-espontánea})/(\text{tratada con Triton x - espontánea}) \times 100$$

- Los anticuerpos anti-Ovr110 con lisis específica aumentada por encima de los anticuerpos de control son terapéuticamente útiles para estimular el sistema inmune para eliminar tumores en el cuerpo usando las propias células efectoras del cuerpo. Los resultados de los ensayos de ADCC *in vitro* que demuestran la eficacia de anticuerpos anti-Ovr110 *in vitro* son indicativos de aquellos anticuerpos que tienen eficacia promoviendo ADCC *in vivo*.

Ejemplo 10: Depósitos

Depósito de líneas celulares y ADN

Las siguientes líneas celulares de hibridoma se depositaron en la American Type Culture Collection (ATCC), localizada en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU. y se les concedieron números de acceso.

- Los nombres de las líneas celulares de hibridoma depositadas pueden acortarse por conveniencia de referencia. Por ejemplo, A57.1 corresponde a Ovr110.A57.1. Estos hibridomas corresponden a los clones (con sus nombre completos) enumerados en la Tabla 13.

Tabla 13: depósitos de la ATCC

Hibridoma	Nº de acceso a la 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
Ovr110.C6.3	PTA-6266	28 de octubre de 2004
Ovr110.C11.1	PTA-7128	30 de septiembre de 2005
Ovr110.C12.1	PTA-7129	30 de septiembre de 2005

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 desde la fecha de depósito. Los organismos estarán disponibles en la ATCC de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest y sujetos a un acuerdo entre diaDexus, Inc. y la ATCC, que asegura la disponibilidad permanente e ilimitada de la descendencia de los cultivos al público tras la expedición de la patente de Estados Unidos pertinente o tras la disposición al público de cualquier solicitud de patente de Estados Unidos o extranjera, lo que suceda primero, y asegura la disponibilidad de la descendencia 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 de conformidad al mismo (incluyendo 37 CFR §1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

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 remplazarán inmediatamente a la notificación con una muestra 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
Li, Wenlu
Burcham, Timothy S
Corral, Laura
Simon, Iris
Papkoﬀ, Jackie

<120> Ovr110 Antibody Compositions and Methods of Use

<130> DEX0519WO

<150> US 60/626.817

<151> 10-11-2004

<160> 47

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 306

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<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	
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
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
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
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 2

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

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
275

<210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 3
ccaatgcatg gtatttcagg gagacactcc 30

<210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 4
cggctagctt ttagcatcag gtaagggctg 30

<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

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

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

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <400> 6
 cttgttttaa acatgaagac attgcctgcc atg 33

 <210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <400> 7
 cggctagcac tcttcacaca tatggatgc 29

 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <400> 8
 cggctagcgg gtctgcttgc cacttcgtc 29

 <210> 9
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <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			
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
<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

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

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

<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

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>

<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	
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

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
<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

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

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

5 <210> 14
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 14
gguguuuuag gcuuggucc 19

15 <210> 15
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 15
cucacagaug cuggcaccu 19

25 <210> 16
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

<400> 16
gguugugucu gugcucuac 19

35 <210> 17
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintético

<400> 17
ccgugcuccu ggggcuggg 19

45 <210> 18
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintético

55 <400> 18
uucuccgaac gugucacgu 19

60 <210> 19
<2.11> 19
<212> ARN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 5
 <400> 19
 ggaguuggau cucucagaa 19
 10
 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 20
 Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg His
 1 5 10 15
 20
 <210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 21
 30
 Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 35
 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 22
 40
 Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Gln Ser
 1 5 10 15
 45
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 50
 <400> 23
 Asp Gly Ile Gln Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser
 1 5 10 15
 55
 <210> 24
 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Sintético

<400> 24

Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Sintético

<400> 25

Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu
1 5 10 15

<210> 26

$\langle 211 \rangle$ 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Sintético

<400> 26

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Sintético

<400> 27

Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Sintético

<400> 28

	Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser Leu
	1 5 10 15
5	<210> 29 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Sintético
	<400> 29
	Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala
	1 5 10 15
15	<210> 30 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Sintético
	<400> 30
25	Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser
	1 5 10 15
30	<210> 31 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Sintético
35	<400> 31
	Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr
	1 5 10 15
40	<210> 32 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> Sintético
	<400> 32
50	Ala Asn Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val
	1 5 10 15
55	<210> 33 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Sintético

<400> 33

Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 34

Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 35

Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 36

Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 37

Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 5 <400> 38
 Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr
 1 5 10 15
 10 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Sintético
 <400> 39
 Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys
 1 5 10 15
 20 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 30 <400> 40
 Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr
 1 5 10 15
 35 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Sintético
 <400> 41
 Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu Ser Glu Ile
 1 5 10 15
 45 <210> 42
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Sintético
 <400> 42

Ser Tyr Asn Thr His Glu Thr Ile Cys Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg
1 5 10 15

Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn
20

5 <210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético
<400> 43

Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala
1 5

15 <210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético
<400> 44

Ser Glu Gln Asp
1

25 <210> 45
<211> 5
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético
35 <400> 45

Ser Met Pro Glu Val
1 5

40 <210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético
<400> 46

Ser Glu Thr Leu Arg
1 5

50 <210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

5

<400> 47

Thr Val Val Trp
i

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 aislado que se une a B7-H4 en una célula de mamífero, siendo producido dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo por un hibridoma seleccionado entre el grupo que consiste en los números de acceso a la American Type Culture Collection PTA-6266, PTA-7128 y PTA-7129, o compitiendo por la unión al mismo epítipo que el epítipo unido por el anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma seleccionado entre el grupo que consiste en los números de acceso a la American Type Culture Collection PTA-6266, PTA-7128 y PTA-7129.
2. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que se internaliza tras la unión a B7-H4 en una célula de mamífero.
3. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo se une a un péptido B7-H4 seleccionado entre las SEC ID N° 32 y 34.
4. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el péptido B7-H4 contiene una modificación post-traducciona.
5. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la modificación post-traducciona es una fosforilación.
6. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo se une al epítipo que consiste en la SEC ID N° 45 ó 46.
7. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la célula de mamífero es una célula cancerosa.
8. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que está conjugado con un agente inhibidor del crecimiento y/o un agente citotóxico.
9. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el agente citotóxico se selecciona entre toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas.
10. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la toxina se selecciona entre ricina, saponina, maitansinoide y caliqueamicina.
11. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado.
12. Una célula que produce el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquier reivindicación precedente.
13. Una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo.
14. Un procedimiento *in vitro* para destruir una célula cancerosa que expresa B7-H4, que comprende poner en contacto la célula cancerosa con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, destruyendo de este modo la célula cancerosa.
15. Una composición para aliviar un cáncer que expresa B7-H4 en un mamífero, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 o una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de ovario, pancreático, pulmonar y de mama.
17. Un procedimiento o composición de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el cáncer de ovario es adenocarcinoma metastásico o seroso, el cáncer de mama es cáncer metastásico o carcinoma ductal infiltrante, el cáncer pancreático es cáncer metastásico o el cáncer pulmonar es cáncer metastásico.
18. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en la que la composición se administra junto con al menos un agente quimioterapéutico.
19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el agente quimioterapéutico es paclitaxel o derivados del mismo.
20. Un procedimiento para determinar si las células de una muestra expresan B7-H4, que comprende
 - (a.) poner en contacto una muestra de células con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en condiciones adecuadas para la unión específica del anticuerpo contra B7-H4 a B7-H4 y
 - (b.) determinar el nivel de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a las células de la muestra, o el nivel

de internalización del anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 por parte de las células de dicha muestra,

en el que la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 a las células de la muestra o la internalización del anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 por parte de las células de la muestra indica que las células de la muestra expresan B7-H4.

21. Un procedimiento para detectar la sobre-expresión de B7-H4 en una muestra celular de ensayo o en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

(a) combinar una muestra celular de ensayo o una muestra sérica con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en condiciones adecuadas para la unión específica del anticuerpo contra B7-H4 a B7-H4 expresado por las células de dicha muestra de ensayo o muestra sérica,

(b) determinar el nivel de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 a las células de la muestra de ensayo o el nivel de B7-H4 en la muestra sérica,

(c) comparar el nivel de anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 unido a las células en la etapa (b) con el nivel de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 a las células de una muestra celular de control,

en el que un aumento en la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 en la muestra celular de ensayo o en el nivel de B7-H4 en la muestra sérica en comparación con el control es indicativo de sobre-expresión de B7-H4 por las células de la muestra celular de ensayo, o en el sujeto.

22. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la muestra celular de ensayo es una muestra celular cancerosa o el sujeto tiene cáncer.

23. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el cáncer es un cáncer de mama, de ovario, pancreático o pulmonar.

24. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el cáncer de ovario es adenocarcinoma metastásico o seroso, el cáncer de mama es cáncer metastásico o carcinoma ductal infiltrante, el cáncer pancreático es cáncer metastásico o el cáncer pulmonar es cáncer metastásico.

25. Un procedimiento de exploración para anticuerpos que se unan a un epítoto que une un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo el procedimiento,

(a.) combinar una muestra que contiene B7-H4 con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para formar una mezcla,

(b.) determinar el nivel de anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 unido a B7-H4 en la mezcla y

(c.) comparar el nivel de anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 unido en la mezcla de la etapa (a) con una mezcla de control,

en el que el nivel de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra B7-H4 a B7-H4 en la mezcla en comparación con el control es indicativo de la unión del anticuerpo de ensayo a un epítoto que une el anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-B7-H4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

26. Una composición para modular la señalización de un receptor de B7-H4 celular inmune de señalización negativa uniendo B7-H4 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 reduciendo de este modo una función inmune suprimida, comprendiendo la composición un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

27. Una composición para aliviar una enfermedad autoinmune que expresa B7-H4 en un mamífero, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

FIGURA 1: Resultados del análisis FACS de células LMTK de ratón transfectadas con Ovr100

Fig. 1A Anticuerpo de burro anti-Ig de ratón-PE Fig. 1B MAb A7.1 y anticuerpo de burro anti-Ig de ratón-PE

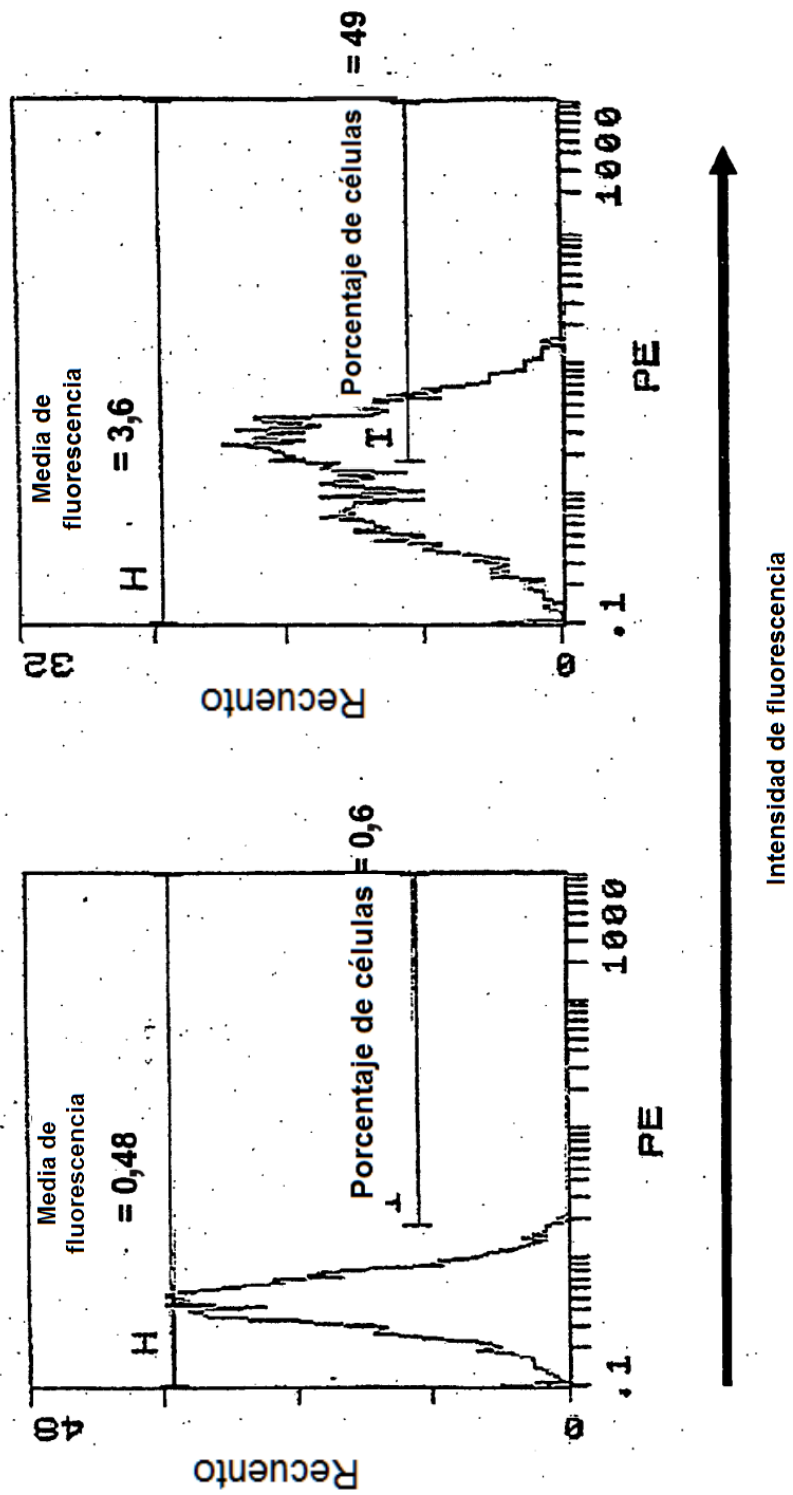
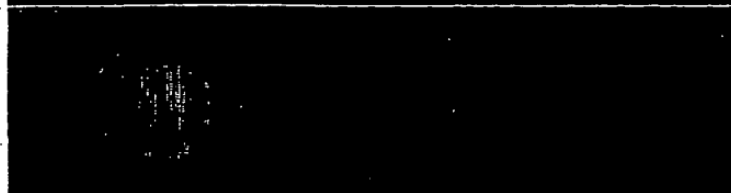


FIGURA 2:

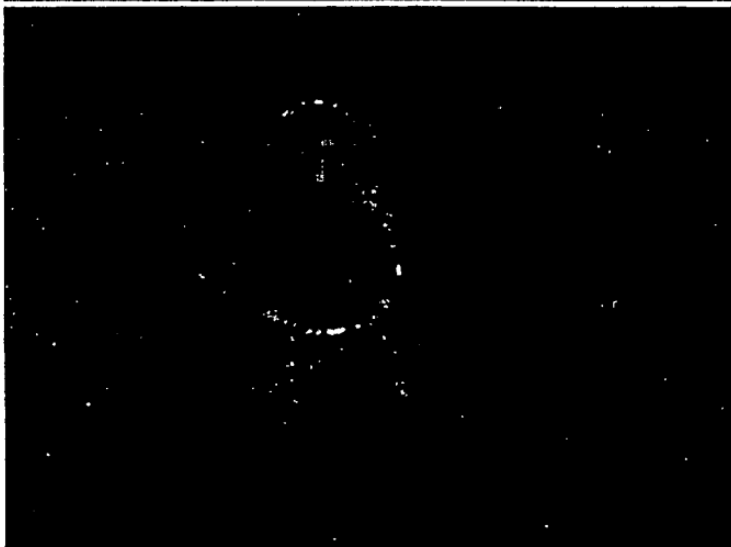
Inmunofluorescencia con Ovr110-A57.1 en células cancerosas vivas de ovario y mama

Fig 2A.



OVCAR-3

Fig 2B.



SKBr-3

Fig 2C.



CaOV-3

FIGURA 3:

Unión de Ovr110-A57.1 e internalización en células cancerosas vivas de ovario y mama

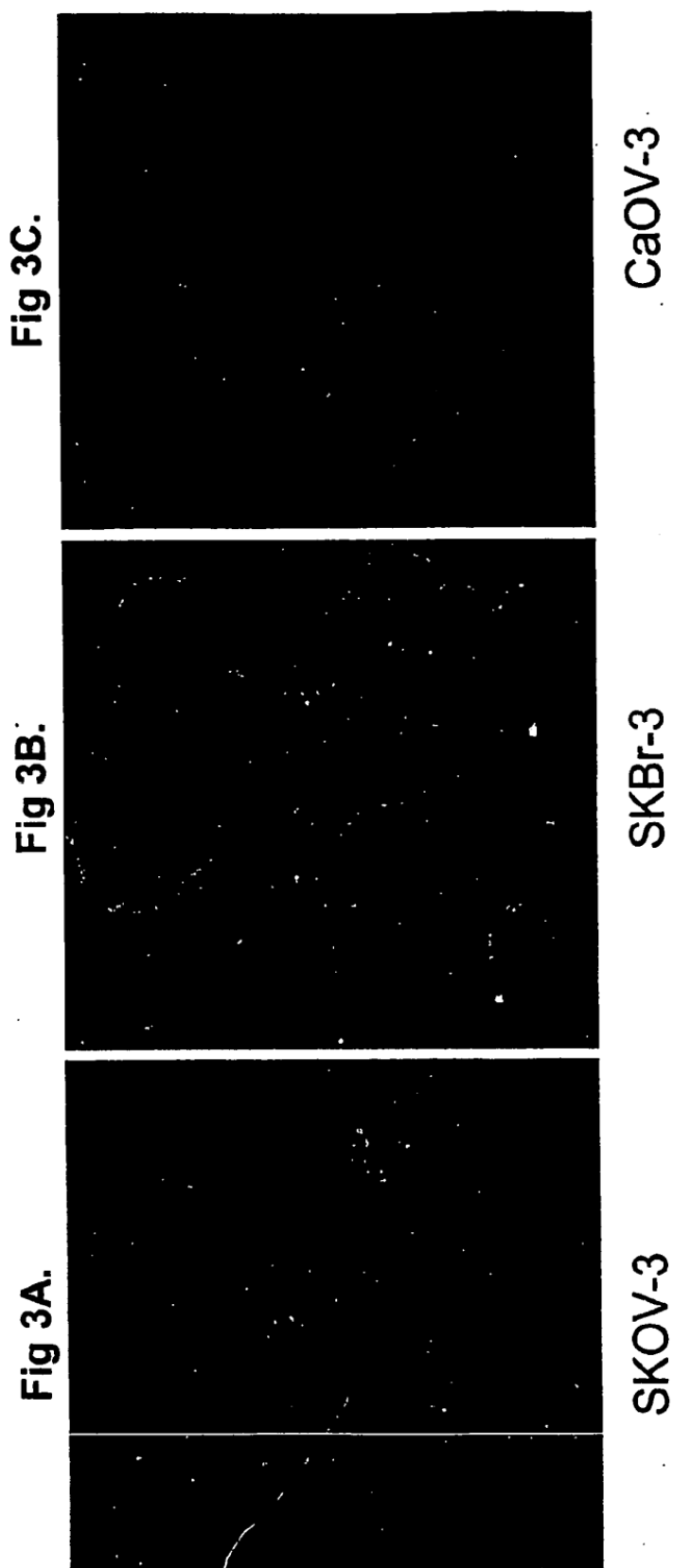


FIGURA 4:
Inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma seroso de ovario

Fig 4A.



Fig 4B.



Fig 4C.

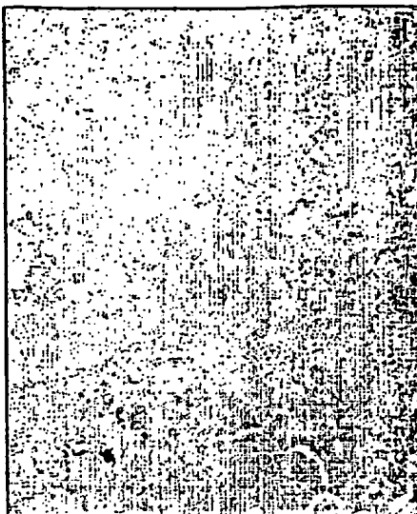


FIGURA 5:
Inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma ductal infiltrante de mama

Fig 5A.



Fig 5B.



Fig 5C.

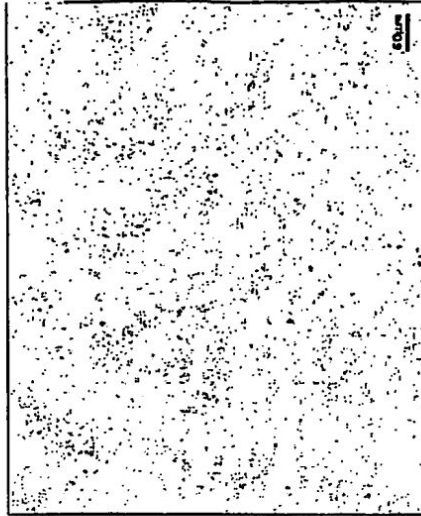


Figura 6:
Inmunohistoquímica con Ovr110-A57.1 en adenocarcinoma pancreático

Fig 6A.

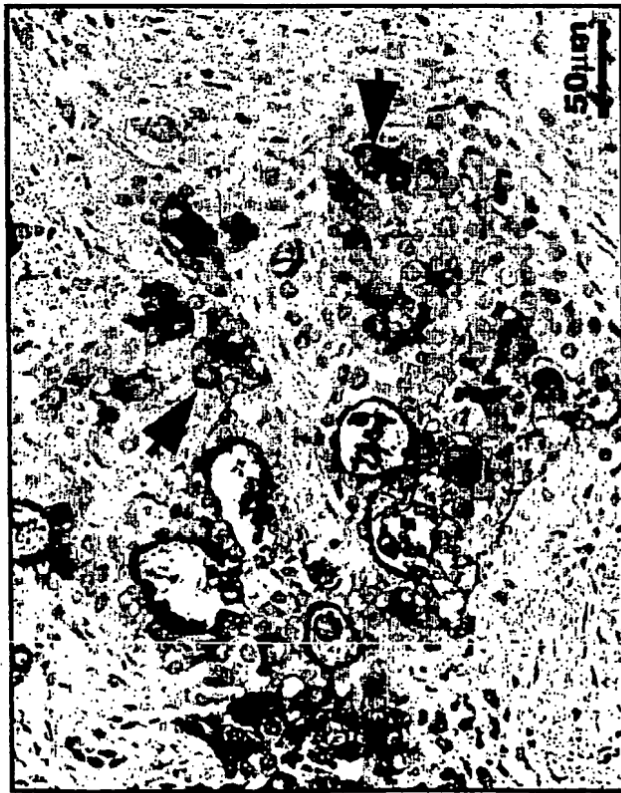
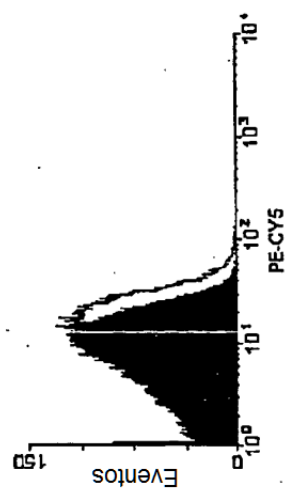


Fig 6B.

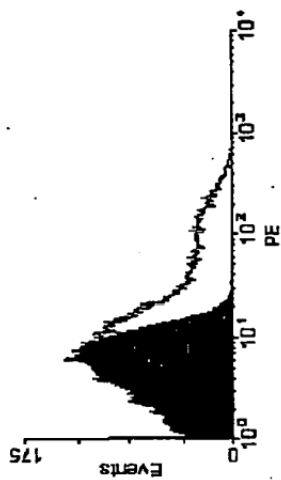


Figura 7A-7F: Expresión de miembros de la familia B7 en células T estimuladas con PHA en el día 3 abiertas en CD3 por FITC

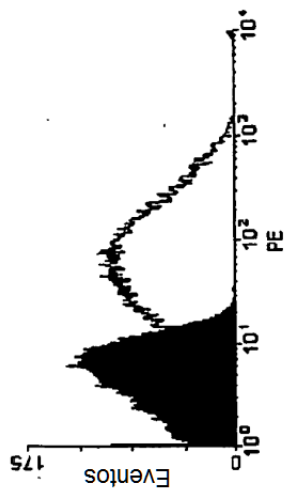
**Fig 7A.
CD80 (B7.1)**



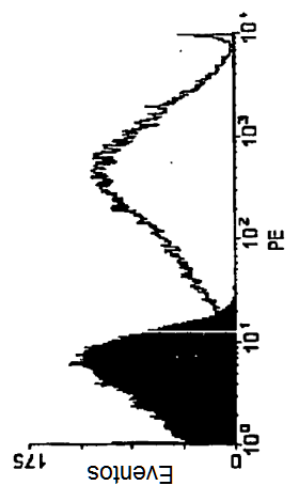
**Fig 7B.
CD86 (B7.2)**



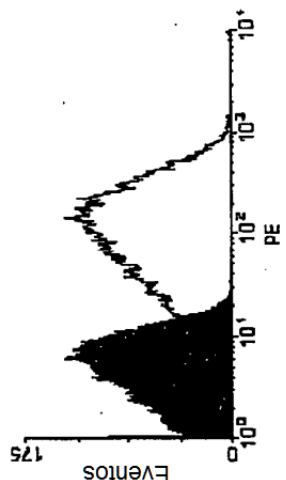
**Fig 7C.
Ovr110 (A57.1)**



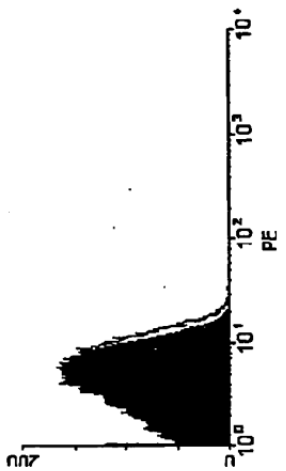
**Fig 7D.
CD71 (Transferrina)**



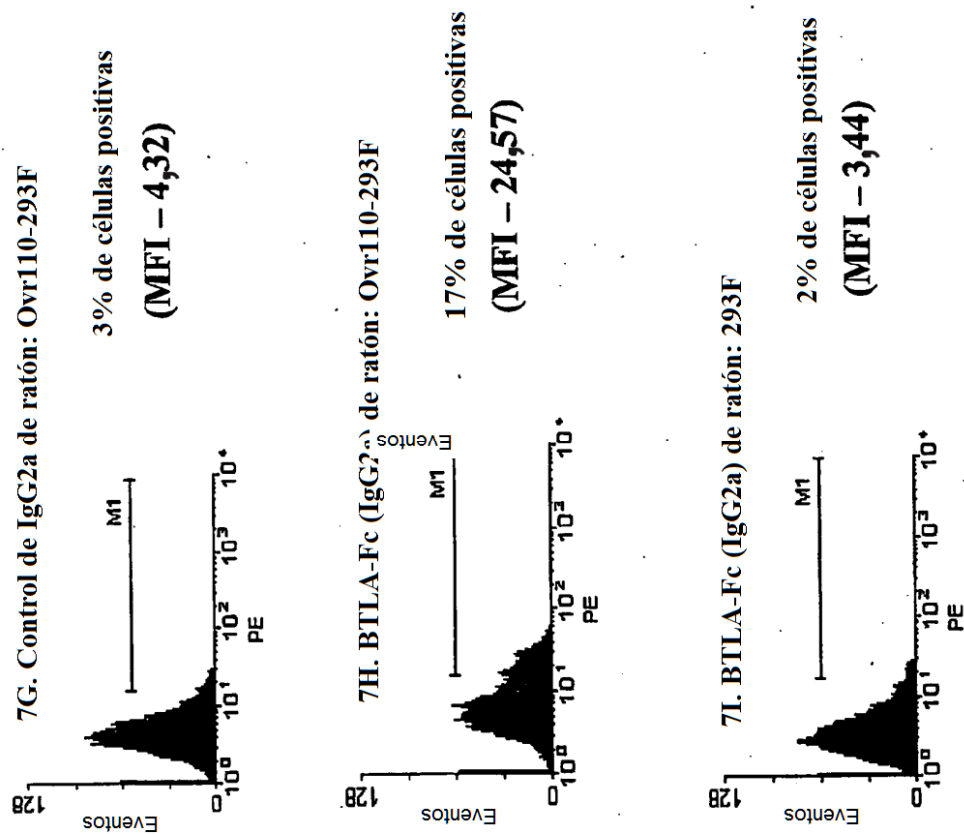
**Fig 7E.
CD25 (IL-2R)**

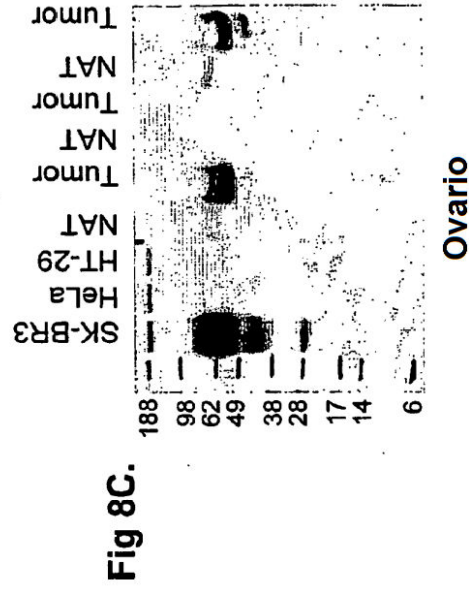


**Fig 7F.
2° Ab solo**



Figuras 7G, 7H, 7I: unión de la proteína de fusión BTLA-Fc a células Ovr110293F





293T-Ovr110
293T-Control
MCF7 (qPCR+)
SKBR3 (qPCR+)
CaOV3 (qPCR-)
HT29 (qPCR-)

Fig 8A.

FIGURA 8:

Detección por transferencia de Western de la proteína Ovr110 con mAb A57.1 en líneas celulares y tejidos tumorales humanos

FIGURA 9

La proteína Ovr110 no se detecta en extractos de órganos principales

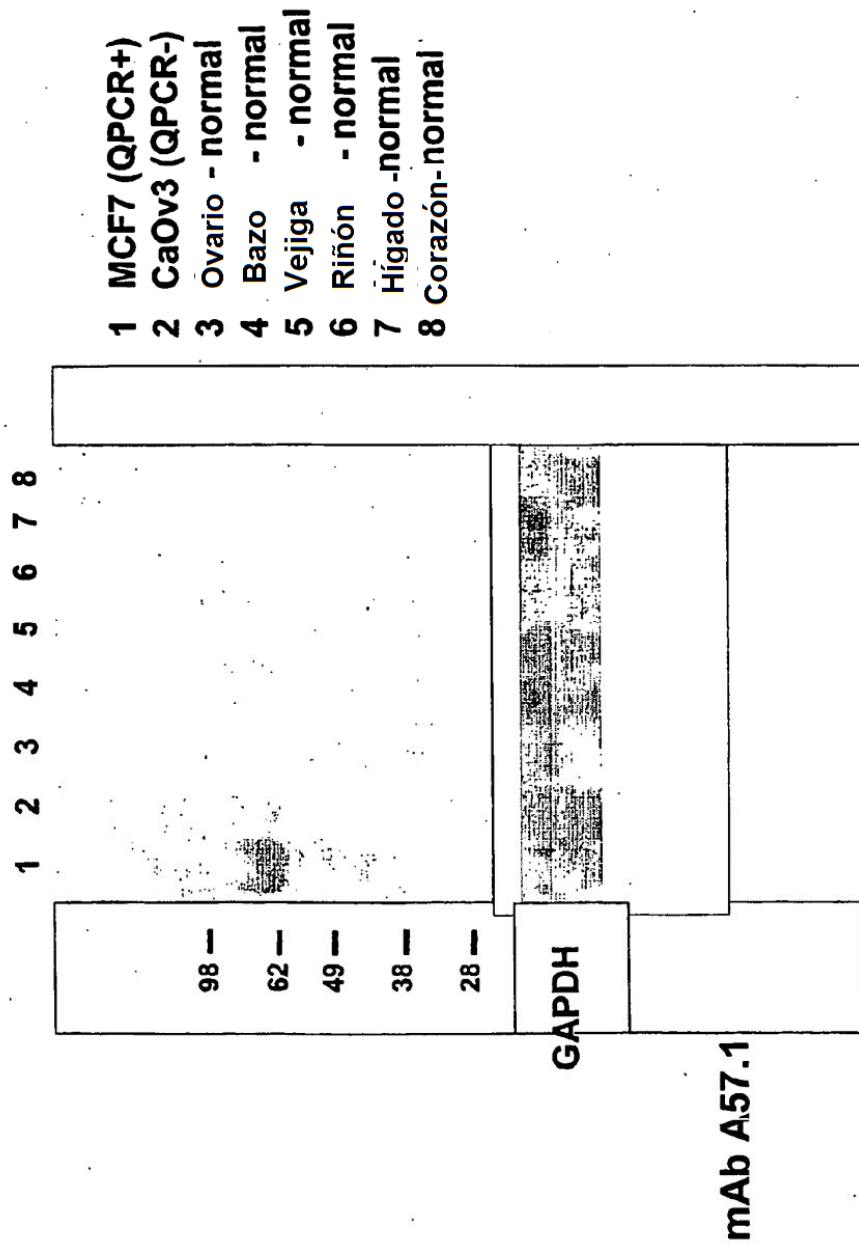
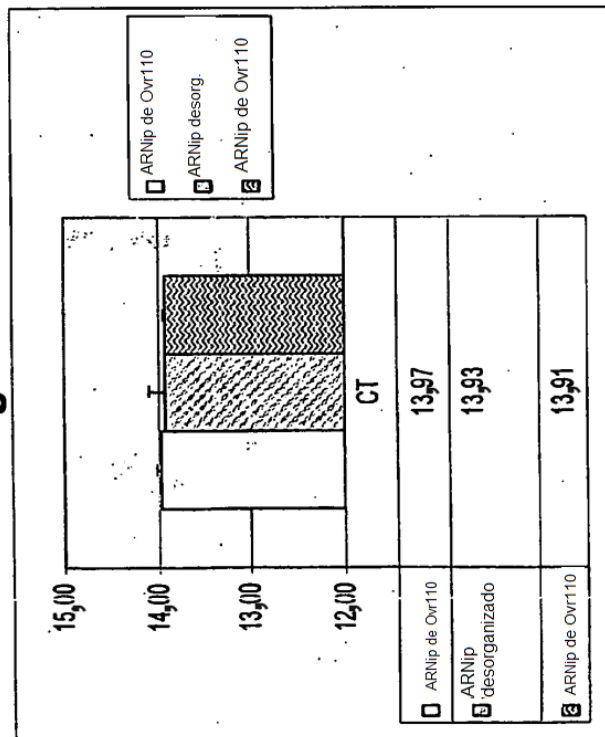


FIGURA 10

Silenciamiento específico del ARNm de Ovr110 en células cancerosas de mama SKBR3

Fig 10A.

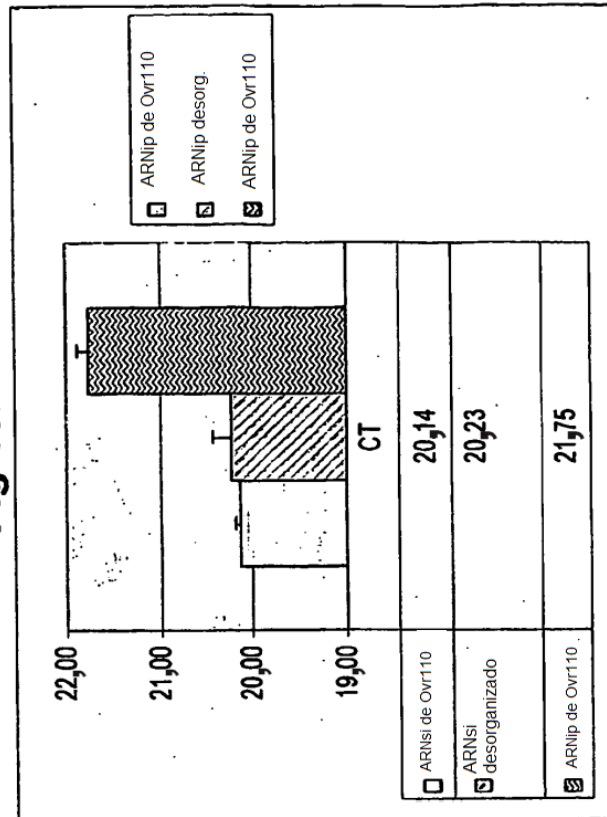


Cebadores de Q-PCR de GAPDH

$$\Delta CT = 0$$

Silenciamiento de GAPDH 0%

Fig 10B.



Cebadores de Q-PCR de Ovr110

$$\Delta CT = 1,5$$

Silenciamiento de Ovr110 65%

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

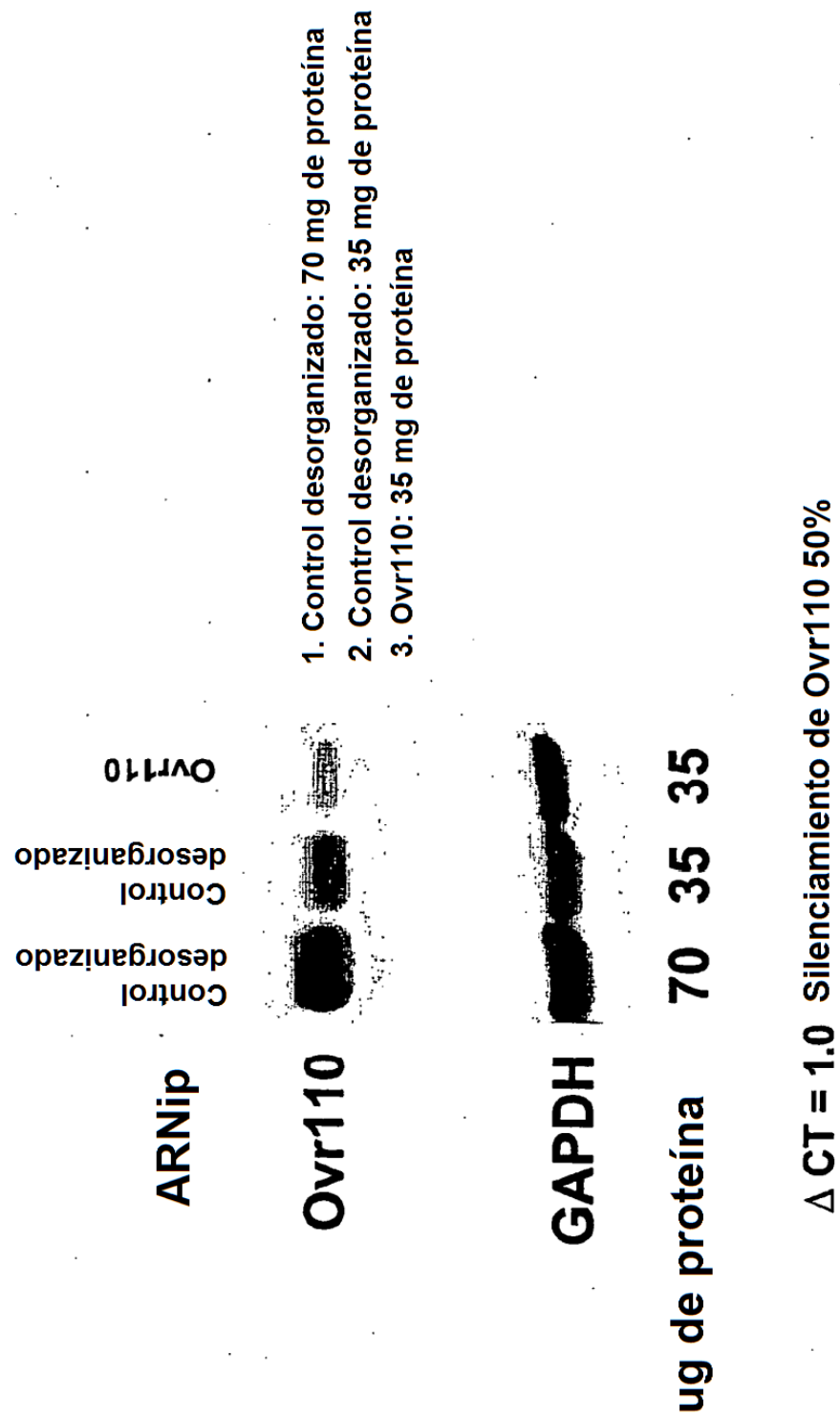


FIGURA 12: El silenciamiento del ARNm de Ovr110 induce la apoptosis en células SKBR3

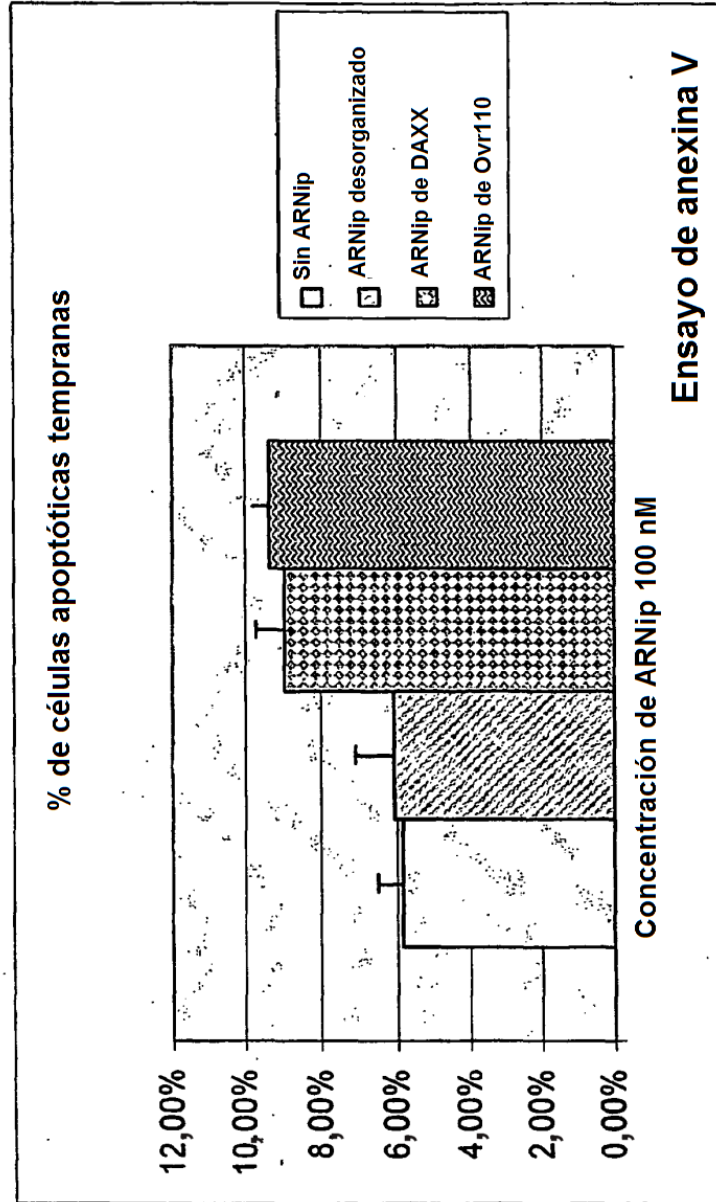
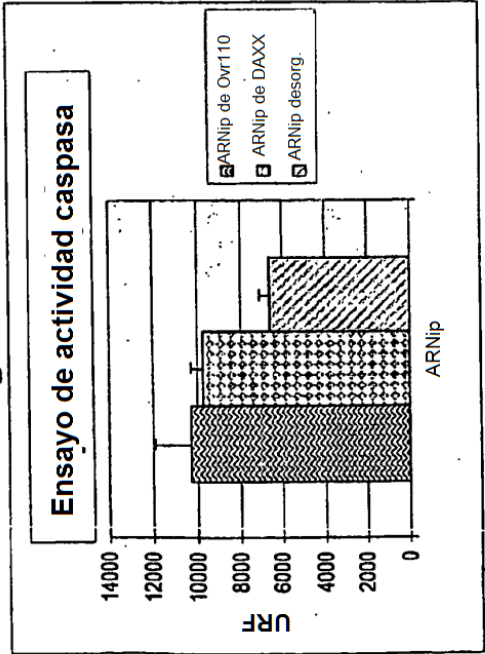


FIGURA 13: El silenciamiento del ARNm de Ovr110 induce la actividad caspasa en células SKBR3

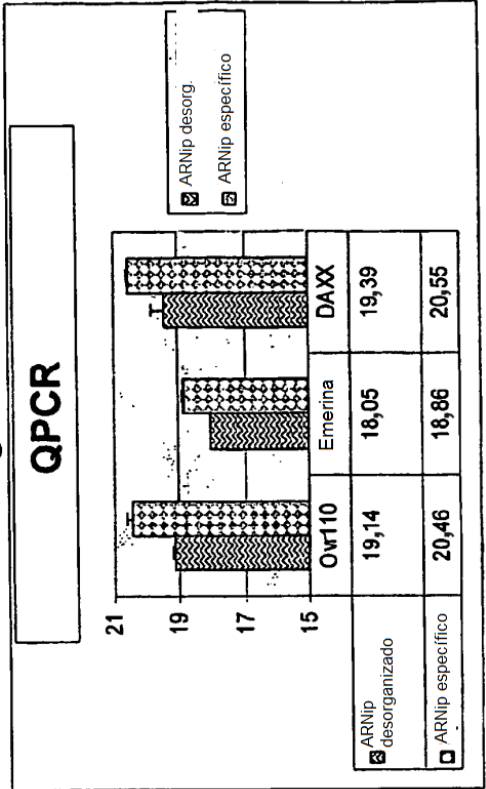
Fig 13A.



DAXX: control positivo

Desorganizado: control negativo

Fig 13B.



$\Delta CT = 1.3$ silenciamiento de Ovr110 66%

$\Delta CT = 1.2$ silenciamiento de DAXX 60%

FIGURA 14:
La sobre-expresión de Ovr110 potencia el crecimiento de xenoinjertos tumorales

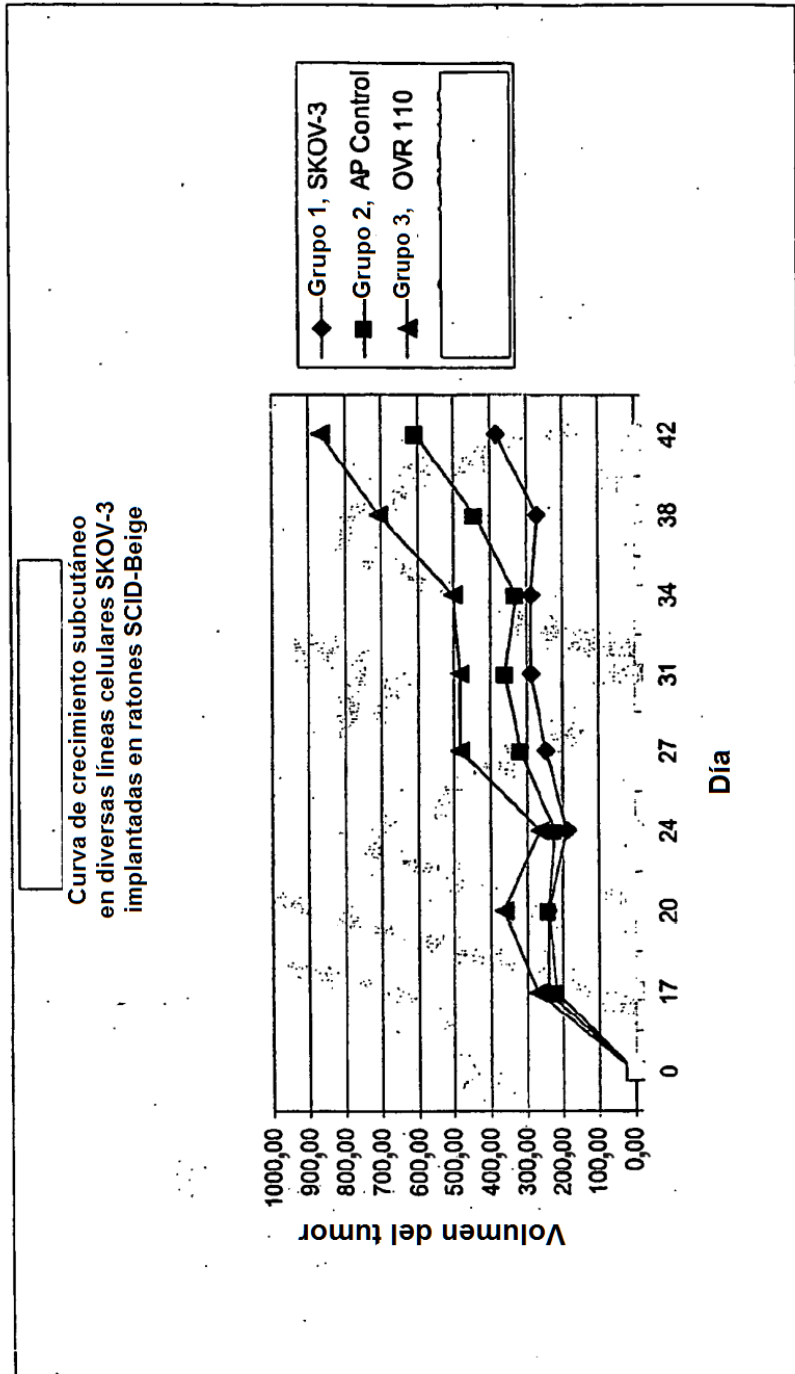


FIGURA 15:

La sobre-expresión de Ovr110 protege de la apoptosis

Fig 15A.

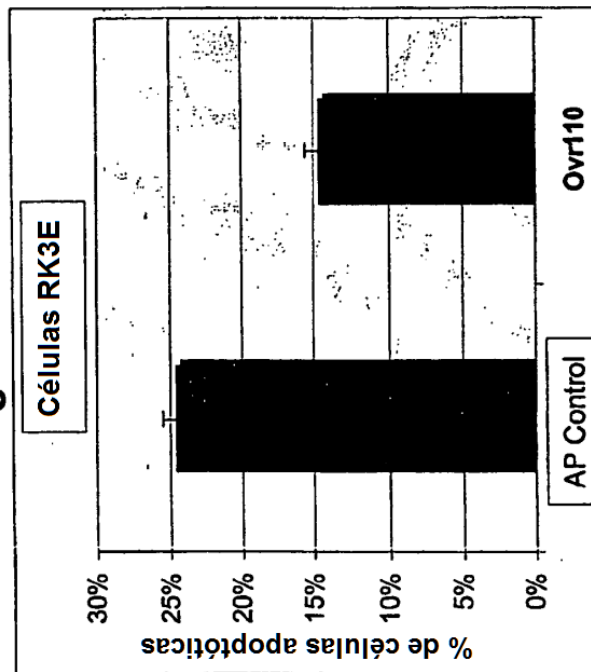
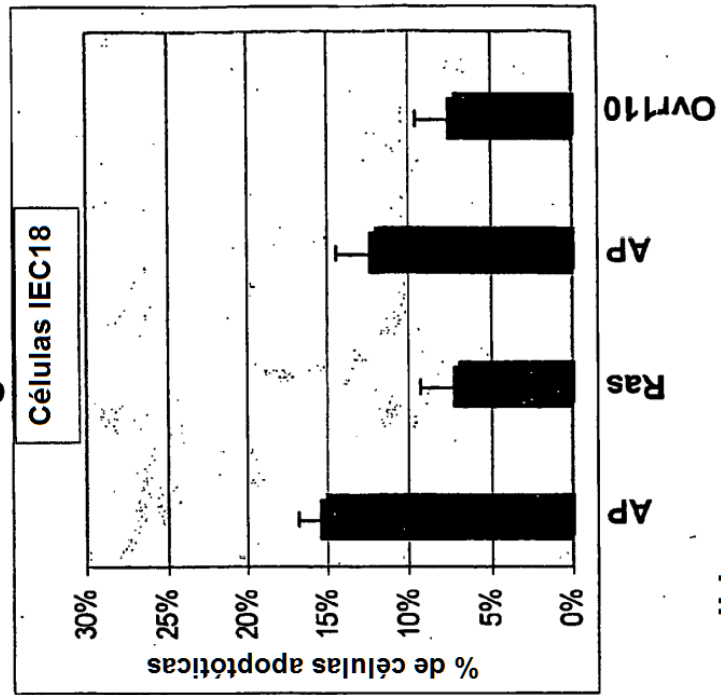


Fig 15B.



Ensayo de anoikis
(medio sin FBS)

FIGURA 16 : Ovr110: mapa de epítopes

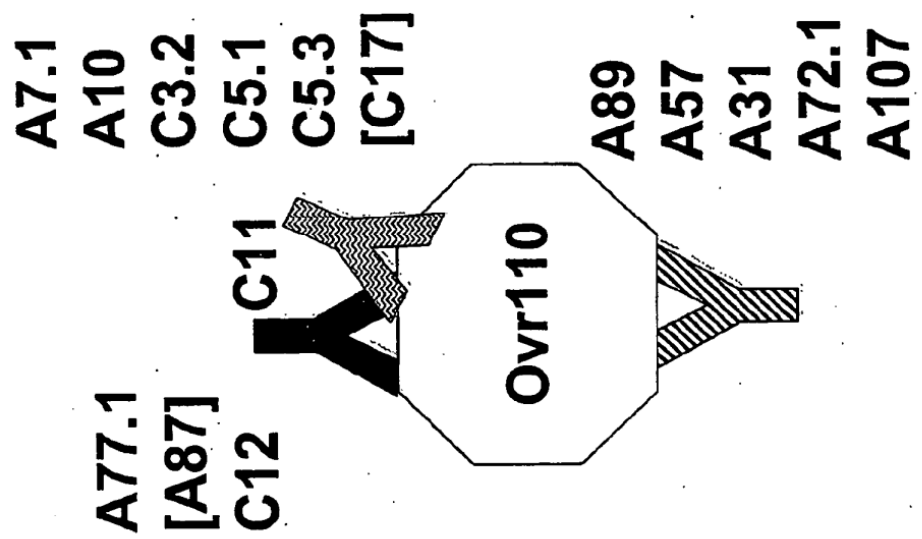


FIGURA 17
Detección de Ovr110 en suero de donantes sanos y pacientes con cáncer

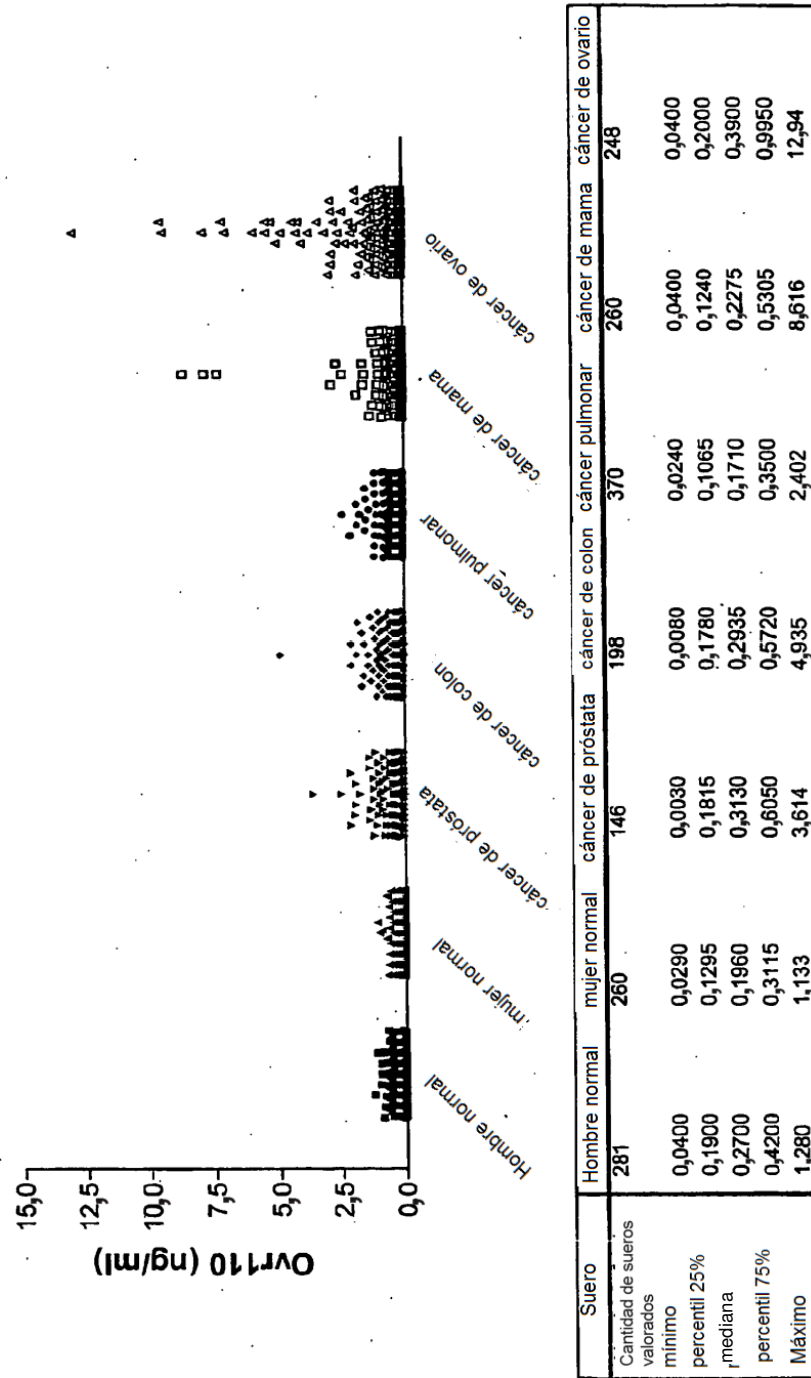


FIGURA 18

Todas las muestras cancerosas y benignas de ovario

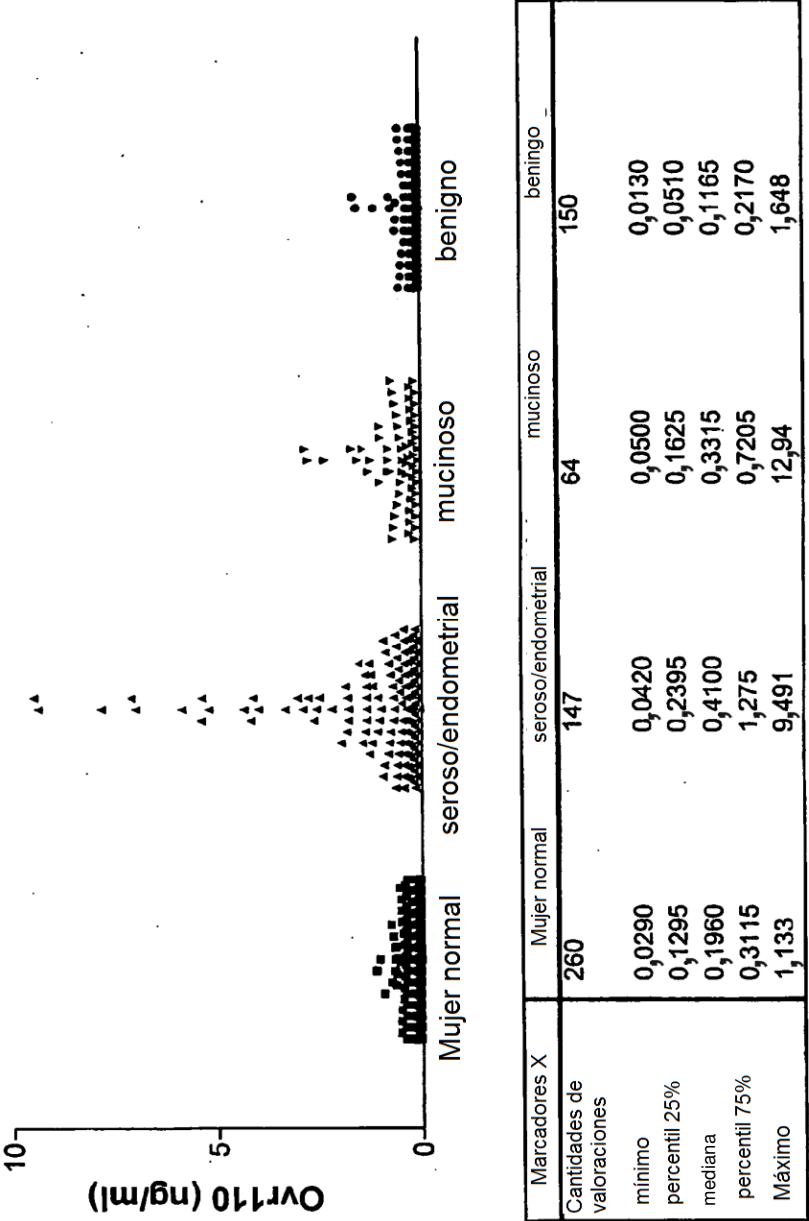


FIGURA 19: Curvas ROC de Ovr110 en cáncer de ovario

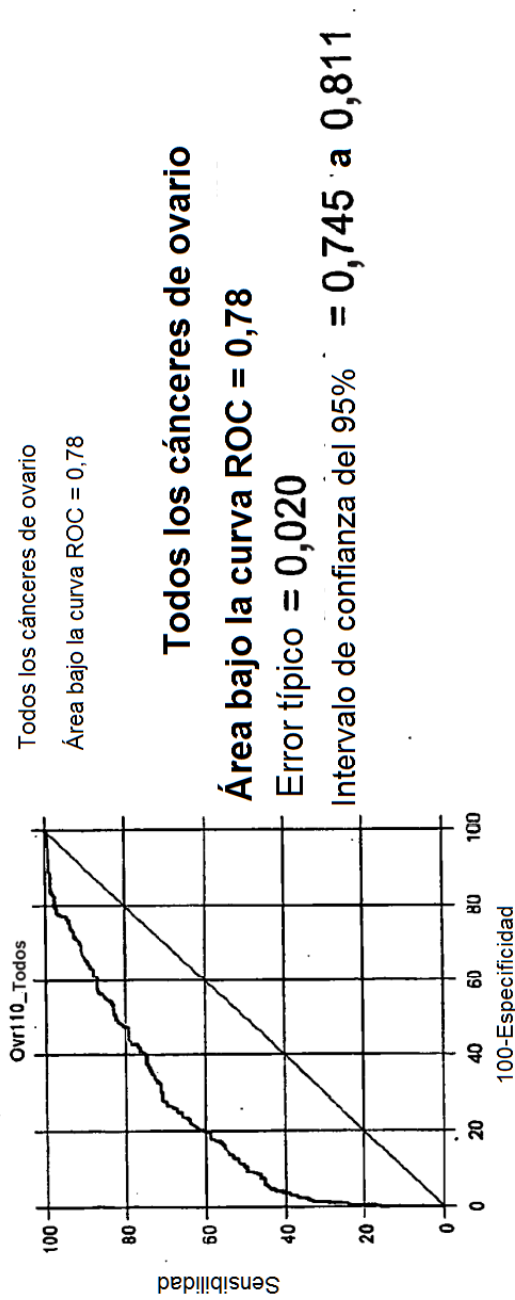


Fig 19A.

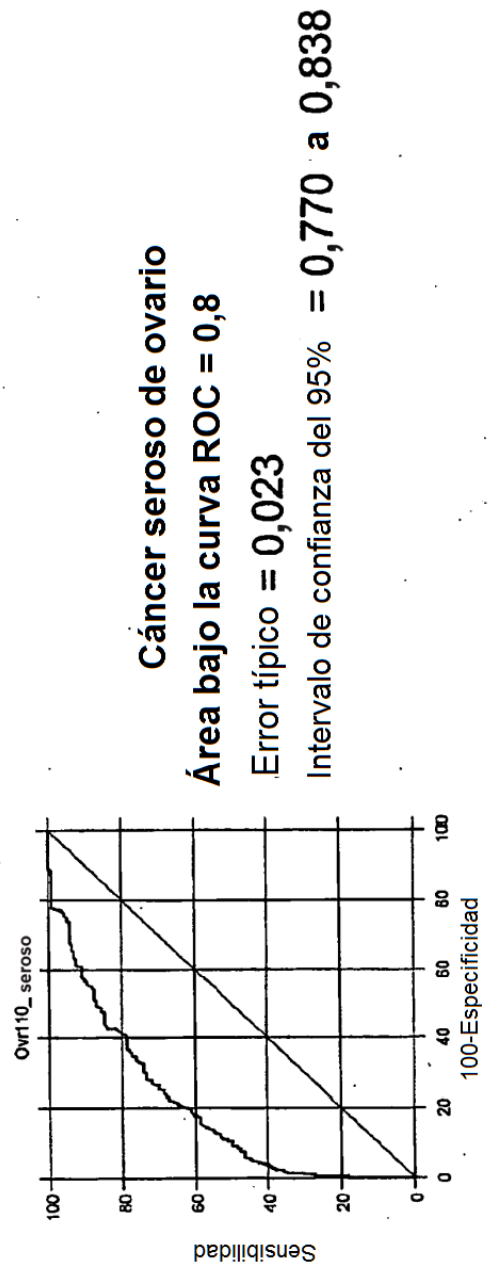


Fig 19B.

Figura 20: Dominios de la proteína Ovr110 y regiones de unión a anticuerpo

MASLGQILFWSIISIIILA GAIALIIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGI
QSC'TFEPDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFR
GRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKNANL
EYK'TGAFSMPEVNDYNASSETLRCEAPRWFPOPTVWASQVDOG
ANFSEVSNTSFELNSENVTMKVSVLYNVTINNNTYSCMIENDIAK
ATGDIKVTESEIKRRSHLQLLSKA_SLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK

LEYENDA DEL DOMINIO Ovr110

Cursiva: región que contiene 20 péptidos solapantes (G21-A258)

Subrayado: región IgV (N47-F150)

Doble subrayado: región IgC (N-156-G236)

Negrita: la región más reconocida por anticuerpos DDX anti-Ovr110 (I131-V185)

Superíndice: péptido señal (M1-A20)

Subíndice: región transmembrana (S259-L281)

Figura 21: Alineación de la proteína Ovr110 y miembros de la familia humana

B7-1-xonly B7-2-xonly B7-H4-xonl	LNFFQLLVGLSHFCSGVHVTKEKVAATSCGHNVS--VLTIR -----QAYFNEITADLPCCQFANSQNLS--V -----GRHSITVTTASAGNCGEDGQSCJFEFDP--LS--VIQ	49 28 40
B7-1-xonly B7-2-xonly B7-H4-xonl	WQKEIKVLLMSCDM-----MPYNNHTLFDLIIN-----LSIMLAL WQD--NL--VLE--YLCKFDSHSYMGRTFDG--W--LRLHNL MLKEGVLG--EFKEGKLSEQDEM--GRTVFDQVI VGNA--SLRLKN	50 72 90
B7-1-xonly B7-2-xonly B7-H4-xonl	PLDGLY-CVY-KYKDQAFKREHLAEVTSVKA--FPTPS--DFEIP--SN Q--KD--CGLY-CILHKKPTGMI--R--HOMNSE--SVLA--FSQPEI--VPI--SN--REN Q--DAGLY-CYL--TSKCKGNANLEYKTC-----AF--SMPE--VDYNA--SE	140 122 134
B7-1-xonly B7-2-xonly B7-H4-xonl	RR--I--CS--SGGFPEPH--SM--ENG--I--A-------TTVSQDPETELYAVS YTN--I--CS--HG--PEPKK--SMLLRT--N--T--EYDGI--MQKSODIN--VILEY--VS TLR--CEAPRWEP--PT--MASQV--G--NFF--EVS--TSFELNSE--Y--	185 172 177
B7-1-xonly B7-2-xonly B7-H4-xonl	SKLDF--I--NI--M--C--I--YGHLE--N--QT--E--MN--TK--HF--PD-- SLSV--F--VT--NM--LFC--ET--DKTR--L--SSPE--ELED--P--PP--PD--P-- K--VSVLY--VT--N--T--SC--I--END--A--ATGDI--KVT--E--L--RSHLQ--LNSK	226 219 227

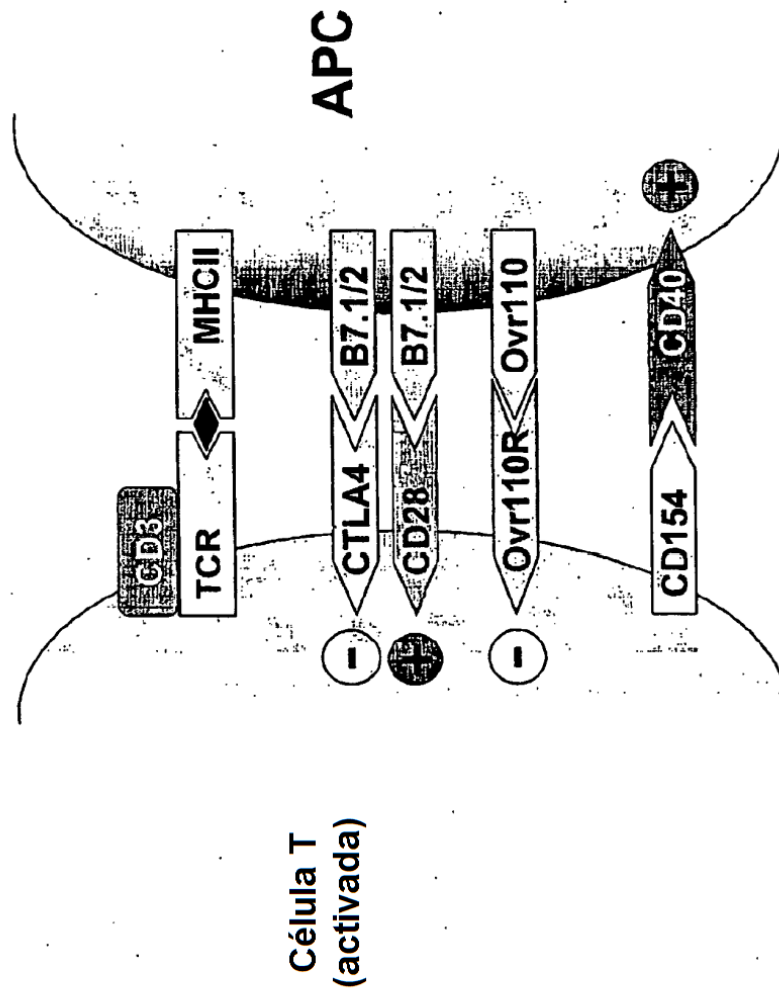
B7-1 (CD80)	NP_005182
B7-2 (CD86)	NP_787058
B7-H4 (Cvr110)	NP_078902

Alineados con ClustalW 1.83

Alineados con ClustaW 1.83

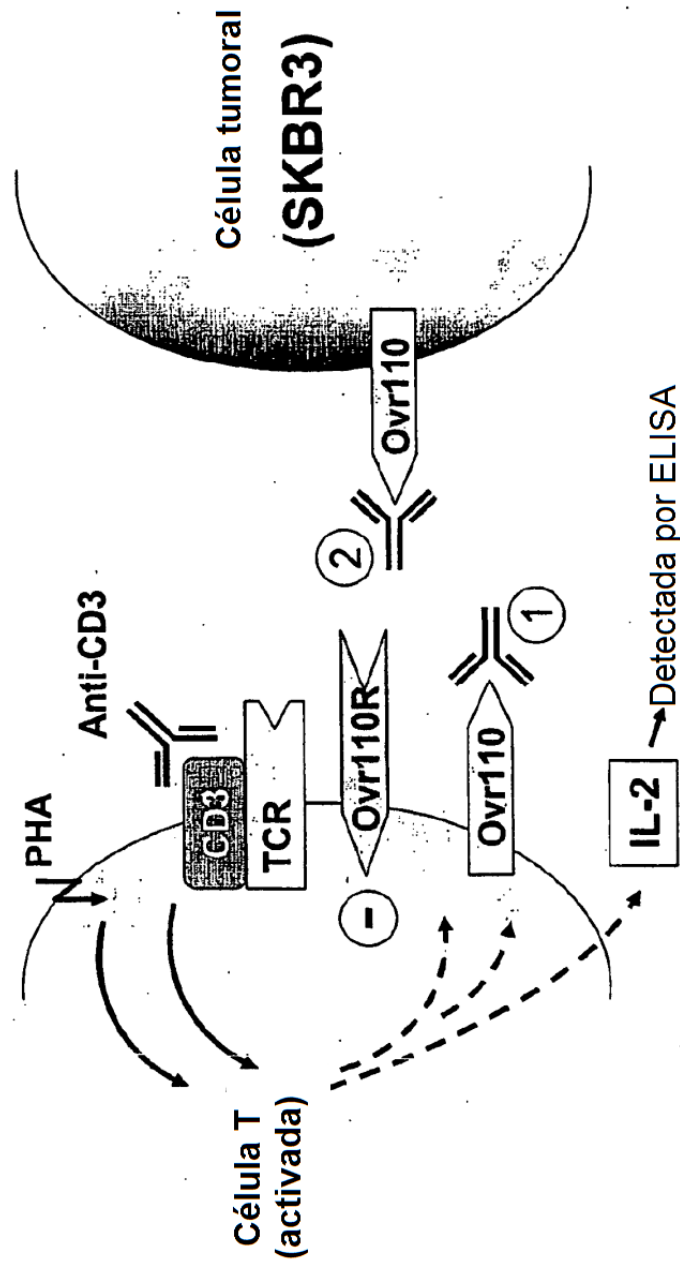
[illegible]

Figura 23: Interacciones ligando-receptor entre células T y APC



- (+)**: La unión ligando-receptor promueve la respuesta inmune
- (-)**: La unión ligando-receptor inhibe la respuesta inmune

Figura 24: Esquema de experimentos funcionales de la proliferación de células T Ovr110



Escenarios de unión del anticuerpo contra Ovr110

- ① La unión del Ab específico para células T Ovr110 reduce la producción de IL-2, lo que indica una actividad reducida de la célula T.
- ② El Ab específico de tumor Ovr110 bloquea la unión del receptor de Ovr110 (Ovr110R) sobre la célula T activada: evita la desactivación de la célula T provocando una actividad persistente o potenciada de la célula T medida por producción estable o aumentada de IL-2