

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 742**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2003 E 10178547 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2301965**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a CA 125/0722P asociado a células y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

16.10.2002 US 418828 P

10.07.2003 US 485986 P

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

14.05.2015

73 Titular/es:

**PURDUE PHARMA L.P. (100.0%)
One Stamford Forum 201 Tresser Boulevard
Stamford, CT 06901-3431, US**

72 Inventor/es:

**ALBONE, EARL, F. y
SOLTIS, DANIEL, A.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 535 742 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos que se unen a CA 125/0722P asociado a células y métodos de uso de los mismos

1. Campo de la invención

5 La presente invención proporciona anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, que preferentemente se unen a polipéptidos CA 125/0772P asociados a células, con respecto a polipéptidos CA 125/0772P desprendidos (*shed*), métodos para identificar dichos anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos, y métodos para producir dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos. La presente descripción proporciona además métodos para prevenir, gestionar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno relacionado con los CA 125/0772P. En particular, la presente descripción proporciona métodos para 10 prevenir, gestionar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno proliferativo celular. Por ejemplo, la presente descripción proporciona métodos para prevenir, gestionar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados al cáncer. En una realización preferida, la presente descripción proporciona métodos para prevenir, gestionar, tratar o mejorar uno o más síntomas del cáncer de ovario. La presente invención proporciona también composiciones y artículos de fabricación para su uso con el fin de prevenir, gestionar, tratar o mejorar uno o más 15 síntomas asociados a un trastorno relacionado con los CA 125/0772P, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario. La presente descripción proporciona todavía adicionalmente métodos para diagnosticar un trastorno relacionado con los CA 125/0772P o la predisposición a desarrollar un trastorno de este tipo.

2. Antecedentes de la invención

20 El polipéptido de alto peso molecular al que se hace referencia como CA 125 se puede detectar en aproximadamente el 80 % de todos los pacientes con carcinomas de ovario (véase Am. J. Clin. Pathol. 79:98-104 (1983), de Kabawat et al., y Gynecol. Oncol. 44:147-154 (1992), de Gadducci et al.). El CA 125 está presente en la superficie de células tumorales, y hay presentes formas secretadas, o "desprendidas", elevadas de CA 125 en aproximadamente entre el 80 y el 90 % de pacientes con cáncer de ovario.

25 Se han producido y utilizado anticuerpos dirigidos contra el CA 125 para la determinación de las concentraciones de CA 125 y para la purificación de CA 125 a partir de medio de cultivo celular. Véase, por ejemplo, J. Clin. Invest. 68(5):1331-1337 (1981), de Bast et al., J.Cel.Biochem. (Suppl.) 12(E):139 (1988), de Krantz et al.; las patentes U.S. n.º 4.921.790, 5.059.680, y 5.976.818; y el documento JP11014626.

30 Además de anticuerpos para monitorizar la presencia de CA 125, las patentes U.S. n.º 5.858.361 y 6.241.985 describen anticuerpos anti-CA 125 anti-idiotipo como agentes terapéuticos. Composiciones que comprenden anticuerpos para terapia y diagnóstico del cáncer, en particular cáncer de ovario se describen en el documento WO 00/36107. Nustad et al., Tumor Biol. 17:196:219 (1996) identifican dos dominios antigénicos principales en CA 125 y sobre esta base clasifica 26 anticuerpos monoclonales que se sometieron a ensayo en cuanto a especificidad y afinidad en tres grupos: similares a C125, similares a M11 y un único anticuerpo OV 197. Nap et al., Tumor Biol. 17:325-331 (1996) se relaciona con la caracterización inmunohistoquímica de 22 anticuerpos monoclonales contra el 35 antígeno CA125.

A pesar de lo anterior, los trastornos relacionados con los CA 125, tales como el cáncer de ovario, siguen siendo un problema importante y, como tales, existe una gran necesidad de métodos y composiciones para el tratamiento de dichos trastornos.

40 La mención o identificación de cualquier referencia en esta sección o cualquier otra de la presente solicitud no se considerará como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior de la presente invención.

3. Resumen de la invención

45 La presente invención está dirigida al anticuerpo aislado como se reivindica en la reivindicación 1, las composiciones farmacéuticas como se reivindica en las reivindicaciones 16, 17 y 20, el artículo fabricado como se reivindica en la reivindicación 18, el polipéptido de fusión como se reivindica en la reivindicación 19, el método para ayudar a identificar un anticuerpo como se reivindica en las reivindicaciones 21 a 23 y el hibridoma como se reivindica en la reivindicación 24.

50 La presente invención se basa, en parte, en el reconocimiento de que los acontecimientos que producen CA 125/0772P desprendidos dejan también una parte de la región extracelular de la secuencia de aminoácidos de los CA 125/0772P en una forma asociado a células, es decir, producen también CA 125/0772P asociados a células. La presente invención se basa además, en parte, en el reconocimiento de que se pueden generar anticuerpos, y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociados a células, con respecto a CA 125/0772P desprendidos, y de que dichos anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, se pueden utilizar, por ejemplo, para prevenir, gestionar, tratar o mejorar un trastorno relacionado con los 55 CA 125/0772P o uno o más síntomas de un trastorno relacionado con los CA 125/0772P, tal como un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une preferentemente a un polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido, como se define en las reivindicaciones. Se proporciona también un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, aislado, que se une al péptido de la Figura 1. Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención son útiles para una variedad de fines terapéuticos, profilácticos, diagnósticos, y de purificación, según se describe en el presente documento.

En otra realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción es aquel que se une al péptido de ID SEC N.º:1 ó ID SEC N.º:2, y se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células. En una realización particular de este tipo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción se une a la región no repetitiva representada en la ID SEC N.º:1 ó ID SEC N.º:2. En otra realización de este tipo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción se une a una región repetitiva representada en la ID SEC N.º:1 ó ID SEC N.º:2.

En una primera realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción presenta, en un Ensayo de Competición ELISA, menos que aproximadamente un 25 %, menos que aproximadamente un 20 %, menos que aproximadamente un 15 %, menos que aproximadamente un 10 %, o menos que aproximadamente un 5 % de inhibición de unión al péptido de la Figura 1 (ID SEC N.º:1) en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/0772P desprendido con respecto al péptido de la Figura 1 (ID SEC N.º:1). En una segunda realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención presenta, en un Ensayo de Competición por Citometría de Flujo, una IC₅₀, medida por porcentaje de células positivas, de por lo menos aproximadamente 0,05 mg/ml, por lo menos aproximadamente 0,25 mg/ml, por lo menos aproximadamente 0,5 mg/ml, por lo menos aproximadamente 0,75 mg/ml, o por lo menos aproximadamente 1,0 mg/ml de CA 125/0772P desprendido. En una tercera realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción se une al péptido de la Figura 1, pero no se une de manera detectable al polipéptido CA 125/0772P desprendido.

Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que satisface una cualquiera de estas tres realizaciones constituye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que "se une preferentemente" a un polipéptido CA 125/0772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/0772P desprendido.

Entre los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción se encuentran anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen al péptido de la Figura 1 (ID SEC N.º:1) con una K_d menor que aproximadamente 100 nM, menor que aproximadamente 10 nM, menor que aproximadamente 1 nM, menor que aproximadamente 100 pM, o menor que aproximadamente 10 pM según se mide por medio del Ensayo de Afinidad BIAcore, que se describe en la Sección 6.4, posteriormente en el presente documento.

Entre las realizaciones preferidas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención se encuentran anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que median la lisis de células tumorales positivas para CA 125/0772P en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos incluyen, por ejemplo, aquellos que median por lo menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 50:1 y con una concentración de 5 µg de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median por lo menos aproximadamente un 20 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 50:1 y con una concentración de 5 µg de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median por lo menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación efector:diana 50:1 y con una concentración de 5,0 µg de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median por lo menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 25:1 y con una concentración de 5 µg de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos por ml; que median por lo menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 12,5:1 y con una concentración de 5 µg de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos por ml; que median por lo menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 12,5:1 y con una concentración de 0,5 µg de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos por ml; o que median por lo menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 12,5:1 y con una concentración de 50 ng de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos por ml.

Realizaciones preferidas de la descripción incluyen también anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que median la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos incluyen, por ejemplo, aquellos que median la lisis en un intervalo de aproximadamente un 15 % de lisis a 5 µg/ml y aproximadamente un 95 % de lisis a una concentración de aproximadamente 0,1 µg/ml de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

Realizaciones preferidas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención incluyen también anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que inhiben el crecimiento tumoral positivo para el CA 125/0772P.

5 En una realización particular, un anticuerpo de la descripción es un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5109), o por el hibridoma 7A11 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5110), o por el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5111), o por el hibridoma 7F10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5112), o por el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5245), o por el hibridoma 7H1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5114), o por el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5115), o por el hibridoma 8B5 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5116), o por el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5246), o por el hibridoma 8E3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5118), o por el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5119), o por el hibridoma 15C9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5106), o por el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5107), o por el hibridoma 16H9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5108), o por el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4567), o por el hibridoma 325.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5120), o por el hibridoma 368.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4568), o por el hibridoma 446.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5549), o por el hibridoma 501.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4569), o por el hibridoma 621.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5121), o por el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5122), o por el hibridoma 654.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5247), o por el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5124), o por el hibridoma 776.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4570).

20 En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que compite con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5109), o por el hibridoma 7A11 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5110), o por el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5111), o por el hibridoma 7F10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5112), o por el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5245), o por el hibridoma 7H1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5114), o por el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5115), o por el hibridoma 8B5 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5116), o por el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5246), o por el hibridoma 8E3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5118), o por el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5119), o por el hibridoma 15C9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5106), o por el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5107), o por el hibridoma 16H9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5108), o por el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4567), o por el hibridoma 325.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5120), o por el hibridoma 368.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4568), o por el hibridoma 446.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5549), o por el hibridoma 501.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4569), o por el hibridoma 621.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5121), o por el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5122), o por el hibridoma 654.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5247), o por el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5124), o por el hibridoma 776.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4570) para unirse a CA 125/0772P asociado a células. Se considera que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención compiten por unirse si compiten por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA y/o un Ensayo de Competición Cruzada FACS. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compite por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA o un Ensayo de Competición Cruzada FACS si la IC₅₀ para el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos. En una realización preferida, la IC₅₀ del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 10 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de unión a antígenos. En una realización preferida, la IC₅₀ del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que un valor aproximadamente equimolar con la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

45 En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera 117.1 ("117.1L") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:27 (117.1L). Aún en otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena pesada 117.1 ("117.1H") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:28 (117.1H). Todavía en otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos descrito es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:27 (117.1L) y una región variable polipeptídica de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:28 (117.1H).

55 En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera 368.1 ("368.1L") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:29 (368.1L). Aún en otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable de cadena pesada 368.1 ("368.1H") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:30 (368.1H). Todavía en otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:29 (368.1L) y una región variable polipeptídica de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:30 (368.1H).

aminoácidos representada en ID SEC N.º:30 (368.1H), ID SEC N.º:32 (501.1H), ID SEC N.º:34 (776.1H), ID SEC N.º:53 (725.1H), o ID SEC N.º:55 (16H9H).

5 En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:33 (16H9L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:30 (368.1H), ID SEC N.º:32 (501.1H), ID SEC N.º:34 (776.1H), ID SEC N.º:53 (725.1H), o ID SEC N.º:55 (16H9H).

10 Los anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos bi-específicos, anticuerpos tri-específicos, anticuerpos multi-específicos, diacuerpos, tricuerpos, anticuerpos de cadena única o anticuerpos anti-idiotipo. En una realización preferida, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal que se une preferentemente al polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto al polipéptido CA 125/0772P desprendido.

15 Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos pueden incluir, entre otros, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, F_vs con enlace de sulfuro, F_vs de cadena única, fragmentos que contengan polipéptido de cadena ligera variable (VL), fragmentos que contengan polipéptido de cadena pesada variable (VH), o fragmentos que contengan una región determinante de complementariedad (CDR), y fragmentos de cualquiera de los anticuerpos enumerados anteriormente.

20 Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos de clase IgG, IgM, IgE, IgD, IgA ó IgY. Los anticuerpos de la invención pueden ser también de cualquier isotipo. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser de un isotipo de cadena pesada IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ ó IgA₂.

25 Todavía adicionalmente, los anticuerpos pueden comprender, por ejemplo, una región de cadena ligera variable, por ejemplo, una región variable de cadena ligera κ ó λ, una región de cadena pesada variable, o una CDR de las mismas, insertada dentro de una región estructurada (*framework*). Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede comprender una región constante C_γ1 ó una región constante C_γ4.

30 En otro aspecto, la presente exposición proporciona células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención. En una realización, un hibridoma de la presente invención es el hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5109), el hibridoma 7A11 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5110), el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5111), el hibridoma 7F10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5112), el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5245), el hibridoma 7H1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5114), el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5115), el hibridoma 8B5 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5116), el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5246), el hibridoma 8E3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5118), el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5119), el hibridoma 15C9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5106), el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5107), el hibridoma 16H9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5108), el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4567), el hibridoma 325.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5120), el hibridoma 368.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4568), el hibridoma 446.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5549), el hibridoma 501.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4569), el hibridoma 621.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5121), el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5122), el hibridoma 654.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5247), el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5124), o el hibridoma 776.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4570).

45 En otra realización, un hibridoma de la presente descripción es un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales que compiten con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5109), el hibridoma 7A11 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5110), el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5111), el hibridoma 7F10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5112), el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5245), el hibridoma 7H1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5114), el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5115), el hibridoma 8B5 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5116), el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5246), el hibridoma 8E3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5118), el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5119), el hibridoma 15C9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5106), el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5107), el hibridoma 16H9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5108), el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4567), el hibridoma 325.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5120), el hibridoma 368.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4568), el hibridoma 446.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5549), el hibridoma 501.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4569), el hibridoma 621.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5121), el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5122), el hibridoma 654.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5247), el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5124), o el hibridoma 776.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4570) para unirse a CA 125/0772P asociado a células. Se considera que los anticuerpos compiten por unirse si compiten por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA y/o un Ensayo de Competición Cruzada FACS. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compete por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA o un Ensayo de Competición Cruzada FACS si la IC₅₀ para el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos. En una realización preferida, la IC₅₀ del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos

competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 10 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de unión a antígenos. En una realización más preferida, la IC₅₀ del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es no mayor que un valor aproximadamente equimolar con la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

- 5 Todavía en otro aspecto, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención.

En otro aspecto, la presente exposición proporciona un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer, es decir, uno que preferentemente se une a polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido, unido operativamente a un agente heterólogo. En una realización de un polipéptido de fusión, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, y el agente heterólogo están unidos operativamente a través de una unión covalente, tal como un enlace peptídico o enlace disulfuro. En otra realización, un polipéptido de fusión, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, y el agente heterólogo pueden estar unidos operativamente a través de una unión no covalente. En otra realización de un polipéptido de fusión dado a conocer, el agente heterólogo comprende una secuencia de aminoácidos o un radioisótopo. En varias realizaciones no limitativas, el agente heterólogo del polipéptido de fusión de la invención comprende un agente citotóxico o un agente detectable, por ejemplo, formador de imágenes.

Se dan a conocer también análogos de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptidos de fusión de la invención que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido, según se define en las reivindicaciones. En una realización, un análogo de este tipo presenta una afinidad aumentada para el CA 125/0772P asociado a células, con respecto a la de un anticuerpo, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptido de fusión pre-modificados correspondientes. En otra realización, un análogo de este tipo presenta una semivida sérica aumentada en comparación con un anticuerpo, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptido de fusión pre-modificados correspondientes. Por ejemplo, entre los análogos de la invención se encuentran análogos del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC® PTA-5109), o por el hibridoma 7A11 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5110), o por el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5111), o por el hibridoma 7F10 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5112), o por el hibridoma 7G101 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5245), o por el hibridoma 7H1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5114), o por el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5115), o por el hibridoma 8B5 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5116), o por el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5246), o por el hibridoma 8E3 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5118), o por el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5119), o por el hibridoma 15C9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5106), o por el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5107), o por el hibridoma 16H9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5108), o por el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4567), o por el hibridoma 325.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5120), o por el hibridoma 368.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4568), o por el hibridoma 446.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5549), o por el hibridoma 501.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4569), o por el hibridoma 621.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5121), o por el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5122), o por el hibridoma 654.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5247), o por el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5124), o por el hibridoma 776.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4570).

En otro aspecto, la presente exposición proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, un polipéptido de fusión, o un análogo de la invención, es decir, uno que se une preferentemente a polipéptido CA 125 /0772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se proporciona también un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Todavía en otro aspecto, se proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica de la invención contenida dentro del material de envasado, encontrándose dicha composición farmacéutica en una forma adecuada para su administración a un sujeto, preferentemente un humano. En una realización, el artículo de fabricación comprende además instrucciones impresas y/o una etiqueta referente al uso o administración de la composición farmacéutica. Las instrucciones y/o etiqueta pueden, por ejemplo, sugerir un régimen de dosificación para evitar o tratar uno o más síntomas de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P, tal como un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario, de útero, de mama, o de pulmón.

Se dan a conocer también métodos para prevenir, tratar, gestionar o mejorar un síntoma de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P, que comprenden: administrar a un sujeto que necesite dicha prevención, tratamiento, gestión, o mejora, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo en una cantidad suficiente para prevenir, tratar, gestionar o mejorar un síntoma del trastorno proliferativo celular, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido.

En una realización, dichos métodos se refieren a la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora de un síntoma de un trastorno proliferativo celular. En otra realización, dichos métodos se refieren a la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora de un síntoma de un cáncer. Todavía en otra realización, dichos métodos se refieren a la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora de un síntoma de cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer de mama o cáncer de pulmón. En una exposición preferida, dichos métodos se refieren a la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora de un síntoma de cáncer de ovario.

En una realización de dichos métodos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos administrado es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal de unión a antígenos. En otra realización de la descripción, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se puede administrar con una concentración de dosificación de entre aproximadamente 5 µg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, preferentemente entre aproximadamente 20 µg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, y más preferentemente entre aproximadamente 100 µg/kg y aproximadamente 5 mg/kg.

Todavía en otra realización, los métodos se llevan a la práctica como parte de una terapia combinada contra el cáncer. Dicha terapia combinada contra el cáncer puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel o cisplatino. Dicha terapia combinada contra el cáncer puede incluir alternativamente, entre otras, una terapia de radiación.

Se proporciona también un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido. En una realización, un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células comprende hacer entrar en contacto un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos con un péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células (por ejemplo, un polipéptido CA 125/0772P asociado a células o incluso el polipéptido CA 125/0772P de longitud completa) en presencia de CA 125/0772P desprendido (preferentemente una cantidad en exceso (peso/peso) de desprendimiento) en condiciones que permitan la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o bien a dicho péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células o bien a dicho CA 125/0772P desprendido. Después de la incubación, se retiran el CA 125/0772P desprendido (con o sin fragmento unido de anticuerpo de unión a antígenos) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos no unido, y se mide la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos unido al péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de dicho método satisface una cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con "se une preferentemente", entonces dicho anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, es uno que se une preferentemente a polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido. En una realización preferida, la relación de CA 125/0772P desprendido con respecto a CA 125/0772P asociado a células en la mezcla de la reacción es aproximadamente 25:1 (peso/peso). Como parte de este método, el CA 125/0772P asociado a células se puede inmovilizar en una superficie sólida. Por ejemplo, el método se puede realizar en un formato ELISA.

Todavía en otra realización, la invención proporciona un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo como se define en las reivindicaciones, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido, que comprende hacer entrar en contacto el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con un péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células y CA 125/0772P desprendido (preferentemente una cantidad en exceso (peso/peso) de desprendimiento), por ejemplo, aproximadamente una cantidad en exceso de 25 veces (peso/peso), en condiciones que permiten la unión del péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, retirar péptido no unido que comprende CA 125/0772P asociado a células, medir la cantidad de péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células al que se ha unido el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, y comparar la cantidad medida con la cantidad de péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se puede unir en ausencia de dicha cantidad de CA 125/0772P desprendido (es decir, una cantidad menor). Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de dicho método satisface una cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con "se une preferentemente", entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une preferentemente a polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido. Como parte de este método, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, se puede inmovilizar en una superficie sólida, por ejemplo, el método se puede realizar en un formato ELISA.

Todavía en otra realización, la invención proporciona un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo como se define en las reivindicaciones, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células según se define en las reivindicaciones, que comprende hacer entrar en contacto el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con una célula que expresa CA 125/0772P y con una cantidad, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0,05 mg/ml, de CA 125/0772P desprendido (preferentemente un exceso de cantidad (peso/peso) de desprendimiento) en condiciones que permiten la unión del CA 125/0772P al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, retirar células no unidas, medir la cantidad de células que expresa CA 125/0772P a las que se ha unido el anticuerpo, o fragmento de unión a

antígenos, y comparar la cantidad medida con la cantidad de células que expresan CA 125/0772P que se une al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en ausencia de dicha cantidad de (es decir, una cantidad menor) CA 125/0772P desprendido. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de dicho método satisface una cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con “se une preferentemente”, entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une preferentemente a polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido. Dicho método se puede realizar, por ejemplo, cuando la medición se realice por técnicas de citometría de flujo, incluyendo, por ejemplo, separación celular activada por fluorescencia (FACS).

Se dan a conocer también métodos para diagnosticar un trastorno relacionado con el CA 125/0772P o la predisposición a un trastorno relacionado con el CA 125/0772P.

3.1. Terminología

Tal como se usa en el presente documento, el término “análogo” en el contexto de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión de la invención se refiere a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión que está modificado con respecto a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión correspondiente de la invención (al que se hace referencia en este contexto como anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión “pre-modificado” de la invención) antes de la modificación presente en el análogo, pero que todavía se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células con respecto a CA 125/0772P desprendido según se reivindica.

La “afinidad” (K_d) de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención queda determinada por el ensayo de afinidad descrito posteriormente en la Sección 6.4.

La expresión “anticuerpo de la invención”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une preferencialmente a polipéptido CA 125/0772P asociado a células con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido según se reivindica. De modo similar, la expresión “fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente a un polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto al polipéptido CA 125/0772P desprendido como se define en las reivindicaciones. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se considera un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de la invención incluso si se une a un polipéptido CA 125/0772P, es decir, un polipéptido CA 125/0772P pre-desprendido, siempre que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se una preferentemente sin embargo a un CA 125/0772P asociado a células, con respecto al CA 125/0772P desprendido como se define en las reivindicaciones. Tal como se describe posteriormente, debido al hecho de que el CA 125/0772P asociado a células, antes del desprendimiento del CA 125/0772P, está presente como parte de CA 125/0772P pre-desprendido, se observa que anticuerpos que preferentemente se unen a CA 125/0772P asociado a células también se puede unir preferentemente a CA 125/0772P pre-desprendido. De este modo, con independencia de si un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une o no al CA 125/0772P, el mismo se considera un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención siempre que satisfaga los criterios expuestos en el presente documento en relación con “se une preferentemente” al polipéptido CA 125/0772P con respecto al CA 125/0772P desprendido. Se observa además que, a no ser que se indique lo contrario, los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se utilizan de manera intercambiable.

La expresión “Ensayo de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos” (ensayo de ADCC) tal como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo de ADCC descrito posteriormente en la Sección 6.5. Como tal, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que media la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC es aquel que se considera positivo cuando se somete a prueba en el ensayo de ADCC descrito posteriormente en la Sección 6.5.

El término “aproximadamente”, tal como se usa en el presente documento, a no ser que se indique lo contrario, se refiere a un valor que está no más que el 10 % por encima o por debajo del valor que está siendo modificado por el término. En el caso de que el valor que se esté modificando sea un tramo de una secuencia de ácido nucleico o aminoácido, el valor modificado resultante será un entero que está no más que el 10 % por encima o por debajo del tramo original. Además, en los casos en los que el 10 % del tramo que está siendo modificado por este término dé como resultado un valor que deba ser menor que 1, entonces se entiende que, tal como se usa en el presente documento, el tramo modificado tiene 1 residuo nucleotídico o de aminoácido más o menos que el valor original.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “se une a” en el contexto de la unión anticuerpo-antígeno, por ejemplo, en el contexto de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente al CA 125/0772P asociado a células, se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen específicamente a un antígeno particular (por ejemplo, el CA 125/0772P asociado a células) y no se unen específicamente a otros antígenos. Preferentemente, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es aquel que se une al CA 125/0772P con una especificidad de por lo menos 5 OD/microgramo de anticuerpo según se determina mediante un Ensayo de Especificidad ELISA, o que se considera

positivo en un Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo. Un péptido o polipéptido que se une a un antígeno se puede unir a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos, análisis BIAcore, Scatchard u otros ensayos conocidos en la técnica. Los anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a un antígeno pueden presentar reactividad cruzada con antígenos relacionados. Preferentemente, los anticuerpos o fragmentos que se unen a un antígeno no presentan reactividad cruzada con otros antígenos. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Segunda Edición, Paul, ed., Raven Press (1989), en las páginas 332 a 336, para obtener una argumentación referente a la especificidad de los anticuerpos. Preferentemente, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión de antígenos de la invención es aquel que se une al péptido de la Figura 1 con una K_d menor que aproximadamente 100 nM, y más preferentemente se une al péptido de la Figura 1 con una K_d menor que aproximadamente 5 nM, todo ello medido con el Ensayo de Afinidad BIAcore, que se describe en la Sección 6.4. Se observa que un anticuerpo que se une preferentemente al CA 125/0772P asociado a células también puede representar sin embargo un anticuerpo que se une específicamente al CA 125/0772P, incluyendo CA 125/0772P desprendido, con respecto a otros antígenos que sean CA 125/0772P. Finalmente, se observa que los términos “específicamente” e “inmunoespecíficamente”, tal como se usan en el presente documento, a no ser que se indique lo contrario, se usan de manera intercambiable.

Ensayo de Especificidad ELISA: este ensayo, tal como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo ELISA descrito posteriormente en la Sección 6.2. Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo en este ensayo (es decir, es específico para el CA 125/0772P) si presenta una absorbancia de entre por lo menos 5 y más de 30 OD/microgramo de anticuerpo.

Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo: este ensayo, tal como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo de citometría de flujo descrito posteriormente en la Sección 6.2. Los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos) se consideran positivos (es decir, son específicos para el CA 125/0772P) si presentan un resultado del Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo dentro de los siguientes intervalos de células positivas: menos que el 5 % de células NIH/3T3 positivas, y por lo menos el 60 % de células NIH/3T3 positivas que producen un polipéptido de ID SEC N.º:2; y/o menos que el 25 % de células SK-OV3 positivas y por lo menos el 80 % de células OVCAR-3 positivas.

Las expresiones “compite por unirse”, y “compite con” tal como se usan en el presente documento en el contexto de dos especies de anticuerpos o especies de fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos (o combinaciones de las mismas) se usan de manera intercambiable. Se considera que un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compete con un segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos si el primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compete con el segundo en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA y/o un Ensayo de Competición Cruzada FACS.

Ensayo de Competición Cruzada ELISA: este ensayo, tal como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo ELISA descrito posteriormente en la Sección 7.0. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compete por unirse en este ensayo si la IC_{50} para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

Ensayo de Competición Cruzada FACS: este ensayo, tal como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo FACS descrito posteriormente en la Sección 7.0. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compete por unirse en este ensayo si la IC_{50} para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

La expresión “CA 125/0772P” o “polipéptido CA 125/0772P”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al polipéptido transmembrana CA 125/0772P pre-desprendido que, una vez desprendido, produce el polipéptido CA 125/0772P desprendido y el polipéptido CA 125/0772P asociado a células. Se ha evidenciado recientemente que la secuencia de aminoácidos publicada en la bibliografía como la secuencia de longitud completa del polipéptido CA 125/0772P no representa de hecho la secuencia de CA 125/0772P de longitud completa. En particular, véanse, por ejemplo, los documentos WO 02/06317 (PCT/US01/22635) y US 2003/0124140, que dan a conocer un polipéptido al que se hace referencia como “0772P”. La secuencia de aminoácidos del 0772P incluye una extensión de la cual se pensaba previamente que era el CA 125 y longitud completa. Debido a que al polipéptido se le hace referencia en la técnica como CA 125 ó como 0772P, al mismo se le hace referencia en el presente documento como “CA 125/0772P”.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “trastorno relacionado con el CA 125/0772P” se refiere a un trastorno que implica o está caracterizado por la presencia de un nivel diferencial de CA 125/0772P asociado a células con respecto a un estado normal correspondiente y/o una sobreabundancia de CA 125/0772P desprendido con respecto a un estado normal correspondiente. Por ejemplo, en el caso del cáncer de ovario, se observa un nivel superior de CA 125/0772P asociado a células o desprendido con respecto al nivel observado en un estado normal (por ejemplo, no canceroso). El nivel diferencial de CA 125/0772P asociado a células y/o desprendido puede ser o bien causante o bien indicativo del trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “CA 125/0772P asociado a células” se refiere a una especie de polipéptido extracelular CA 125/0772P que permanece en la forma asociada a células aunque de manera temporal, por ejemplo, antes de la renovación (*turn-over*), después de que una parte del polipéptido CA 125/0772P pre-desprendido se haya liberado como CA 125/0772P desprendido. Por ejemplo, una especie de CA 125/0772P asociado a células es una especie de polipéptido extracelular CA 125/0772P que permanece en la forma asociada a células en la superficie de células de la línea celular OVCAR-3 (HTB-161; ATCC®) o células ascíticas humanas después de que una parte del polipéptido CA 125/0772P se haya liberado como CA 125/0772P desprendido. Una especie de polipéptido asociado a células CA 125/0772P está presente dentro de los residuos de aminoácidos 1 a 708 de ID SEC N.º:1 y dentro de los residuos de aminoácidos 1 a 711 de ID SEC N.º:2. Por otra parte, el CA 125/0772P se puede escindir en un sitio de escisión por proteasas situado en los residuos de aminoácidos 659 a 665 de ID SEC N.º:2. Véase *Tumour Biol.* 23(3):154-169 (2002), de O'Brien et al. Como tal, un polipéptido CA 125/0772P asociado a células puede incluir residuos de aminoácidos 659 a 711 de ID SEC N.º:2.

La expresión “Ensayo de Citotoxicidad Dependiente de Complemento” (Ensayo de CDC) tal como se usa en el presente documento se refiere al ensayo de CDC descrito en la Sección 6.5 posteriormente. Como tal, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que media la lisis de células tumorales en un ensayo de CDC es aquel que se considera positivo cuando se somete a prueba en el ensayo de CDC descrito posteriormente en la Sección 6.5.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se usan de manera intercambiable para referirse a una afección en un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento” en la expresión “fragmento de anticuerpo de unión a antígenos” se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 5 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 10 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 15 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 20 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 25 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 40 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 50 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 60 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 70 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 80 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 90 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 100 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 110 residuos de aminoácidos contiguos, o por lo menos aproximadamente 120 residuos de aminoácidos contiguos, de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo que se une preferentemente al CA 125/0772P asociado a células.

La expresión “célula hospedadora” tal como se usa en el presente documento se refiere a la célula particular, incluyendo una célula de mamífero u otras células eucariotas o células procariotas, transformándose o transfectándose, por ejemplo, dichas células con una molécula de ácido nucleico o infectándose con virus, fagémidos o bacteriófagos, y a la progenie o potencial progenie de dicha célula. La progenie de una célula de este tipo puede no ser idéntica a la célula madre transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias del entorno o a manipulaciones recombinantes adicionales que se pueden producir en sucesivas generaciones o integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula hospedadora.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “hibrida en condiciones estrictas” describe condiciones para la hibridación y el lavado bajo las cuales, secuencias nucleotídicas por lo menos un 75 % idénticas entre sí permanecen típicamente hibridadas al complemento mutuo. Dichas condiciones estrictas son conocidas para aquellos expertos en la materia y se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons (1989-2002) en las secciones 6.3.1-6.3.6. En un ejemplo no limitativo, son condiciones de hibridación estrictas una hibridación a 6X cloruro sódico/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguida por uno o más lavados en 0,1XSSC, SDS 0,2 % a aproximadamente 68 °C. En un ejemplo no limitativo, preferido, son condiciones de hibridación estrictas una hibridación en 6XSSC a aproximadamente 45 °C, seguida por uno o más lavados en 0,2 X SSC, SDS 0,1 % entre 50 y 65 °C (es decir, uno o más lavados a 50 °C, 55 °C, 60 °C ó 65 °C). Se entiende que en ciertas realizaciones los ácidos nucleicos de la descripción no incluyen moléculas de ácido nucleico que hibridan bajo estas condiciones exclusivamente a una secuencia nucleotídica que consta de solamente nucleótidos A ó T.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado” en el contexto de un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se refiere a un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que está sustancialmente exento de material celular o proteínas contaminantes de la fuente celular o de tejido de la cual se deriva u obtiene, o sustancialmente exento de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión “sustancialmente exento de material celular o proteína contaminante” incluye preparaciones de un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en las que el péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos está separado de componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o produce de manera recombinante. De este modo, un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que

está sustancialmente exento de material celular o proteína contaminante incluye preparaciones de un péptido, polipéptido proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que tiene menos que aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 5 % (en peso seco) de otra proteína. Cuando el péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se produce de manera recombinante, preferentemente el mismo también está exento sustancialmente de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos que aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 10 %, o aproximadamente el 5 % del volumen de la preparación de la proteína. Cuando el péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se produce mediante síntesis química, el mismo preferentemente está de forma sustancial exento de precursores químicos u otros productos químicos es decir, está separado de precursores químicos u otros productos químicos que estén implicados en la síntesis del péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos. Por consiguiente, dichas preparaciones de un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos tienen menos que aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 5 % (en peso seco) de precursores o compuestos químicos que no sean el péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de interés.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" en el contexto de moléculas de ácido nucleico se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente celular natural de la molécula de ácido nucleico. Alternativamente, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de cADN, puede estar sustancialmente exenta de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "gestionar", "gestionando" y "gestión" se refieren a los efectos beneficiosos que obtiene un sujeto de un agente, por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión de la invención, que no da como resultado una cura de la enfermedad. En ciertas realizaciones, a un sujeto se le administran uno o más de estos agentes para "gestionar" un trastorno con el fin de prevenir o ralentizar la progresión o empeoramiento del trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon celular, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o fágico, y que no depende del método mediante el cual se produce. Por lo tanto, un "anticuerpo monoclonal" se puede referir a una composición que comprende una población de anticuerpos que se unen, cada uno de ellos, a un único epítipo en donde dicha composición carece de anticuerpos que se unen a un epítipo diferente que el epítipo único al que se une la población de anticuerpos. Evidentemente, se observa que, en ciertos casos, hay presente un único epítipo en un polipéptido en múltiples posiciones. En tales casos, aunque el anticuerpo monoclonal puede unirse a múltiples posiciones, se sigue considerando sin embargo que el mismo se está uniendo a un único epítipo.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "ácidos nucleicos" y "secuencias nucleotídicas" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Dichos análogos se pueden generar usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, inosina o bases tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprendan esqueletos estructurales modificados que conduzcan a atributos beneficiosos para las moléculas, tales como, por ejemplo, resistencia a la nucleasa o un aumento de la capacidad de cruzar membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias nucleotídicas pueden ser monocatenarios, bicatenarios, pueden contener partes tanto monocatenarias como bicatenarias, y pueden contener partes tricatenarias, aunque preferentemente son ADN bicatenario.

La expresión "enlazado operativamente" tal como se usa en el presente documento en el contexto de un polipéptido de fusión se refiere a cualquier interacción covalente o no covalente que conecta el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos con el agente heterólogo. El enlace operativo puede ser directo o indirecto. Por ejemplo, puede haber presente una secuencia de aminoácidos entre el anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) y el agente heterólogo.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo que "preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células", "preferentemente se une a polipéptido CA 125/0772P asociado a células", "preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido" o "preferentemente se une a polipéptido CA 125/0772P con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que resulta positivo cuando se somete a prueba en un Ensayo de Competición ELISA o un Ensayo de Competición por Citometría de Flujo, según se describe en el presente documento. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es aquel que resulta positivo tanto en un Ensayo de Competición ELISA como en un Ensayo de Competición por Citometría de Flujo, tal como se describe en el presente documento.

Ensayo de Competición ELISA: este ensayo, tal como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo ELISA descrito en la Sección 6.3 posteriormente. Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo en este ensayo (es decir, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células) si el mismo presenta menos que aproximadamente un 25 % de inhibición de la unión en un exceso de 25 veces peso/peso de CA 125/0772P desprendido con respecto al péptido de la Figura 1 (ID SEC N.º:1).

Ensayo de Competición por Citometría de Flujo: este ensayo, tal como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo por citometría de flujo descrito posteriormente en la Sección 6.3. Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo (es decir, se considera que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el mismo presenta una IC₅₀, según se mide mediante porcentaje de células positivas, de por lo menos 0,05 mg/ml de CA 125/0772P desprendido, es decir, si el mismo requiere por lo menos 0,05 mg/ml de CA 125/0772P desprendido para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría de Flujo en la mitad.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “prevenir”, “previniendo” y “prevención” se refieren a impedir la recidiva o aparición de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P o uno o más síntomas de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P en un sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, un “protocolo” incluye esquemas de dosificación y regímenes de dosificación. Los protocolos en el presente documento son métodos de uso e incluyen protocolos profilácticos y terapéuticos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “polipéptido CA 125/0772P desprendido” se refiere a una secuencia polipeptídica extracelular CA 125/0772P que llega a separarse y liberarse de polipéptidos CA 125/0772P expresados en la superficie de células que expresan el CA 125/0772P, dejando una especie de CA 125/0772P asociada a células que permanece sobre la superficie celular, aunque de manera temporal. La expresión, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una especie de CA 125/0772P desprendido que se encuentra en suero humano y/o sobrenadante de cultivo de línea celular OVCAR-3 (HTB-161; ATCC). Dichos polipéptidos CA 125/0772P desprendidos se pueden obtener a través del protocolo de Tumour Biol. 14/(1):18-29 (1993), de los Frailes et al., usando ascitis humana o sobrenadantes de OVCAR-3. Alternativamente, se pueden obtener polipéptidos CA 125/0772P desprendidos a través de fuentes comerciales tales como Fitzgerald Industries International (Concord, MA), Scripps Laboratories (La Jolla, CA), o United States Biochemical Corp (Cleveland, OH).

Tal como se usan en el presente documento, los términos “sujeto” y “paciente” se utilizan de manera intercambiable. Tal como se usan en el presente documento, los términos “sujeto” y “sujetos” se refieren a un animal, preferentemente un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, burro, cabra, camello, gato, perro, cobaya, rata, ratón, oveja) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cynomolgus, un gorila, un chimpancé, y un humano), preferentemente un humano. En una realización, el sujeto es un sujeto con cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “tratar”, “tratamiento” y “tratando” se refieren a la mejora de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P que es el resultado de la administración de uno o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en el presente documento significa una composición, por ejemplo, un vehículo, excipiente, o sal, aprobada por una agencia reguladora del Gobierno federal o de un estado o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida de forma general para su uso en animales, y más particularmente, en humanos.

4. Breve descripción de los dibujos

FIG. 1: Representa la secuencia de aminoácidos de tres repeticiones de CA 125/0772P (ID SEC N.º:1). Los residuos en cursiva desde el aminoácido 14 al aminoácido 452 representan regiones repetitivas. Cada una de las tres repeticiones dentro de la región repetitiva de 14 a 452 está delimitada por líneas verticales y flechas tal como se muestra. Los residuos subrayados representan la región no repetitiva proximal a la transmembrana. La secuencia que viene a continuación de los residuos subrayados no es parte del CA 125/0772P e incluye una etiqueta carboxi-Myc-His.

FIG. 2: Representa la secuencia de aminoácidos de tres repeticiones TM de CA 125/0772P (ID SEC N.º:2). Los residuos subrayados, en cursiva, es decir, desde el aminoácido 14 al aminoácido 452, representan regiones repetitivas. Cada una de las tres repeticiones dentro de la región repetitiva de 14 a 452 está delimitada por líneas verticales y flechas tal como se muestra. Los residuos subrayados, que no están en cursiva, es decir, desde el aminoácido 453 al aminoácido 711, representan la región no repetitiva proximal a la transmembrana. Los residuos en cursiva, no subrayados, es decir, desde el aminoácido 712 al aminoácido 738, representan el dominio de transmembrana. Los residuos en negrita, es decir, desde el aminoácido 739 al aminoácido 769, representan una región citoplasmática. La secuencia que viene a continuación de los residuos en negrita no es parte del CA 125/0772P e incluye una etiqueta carboxi-Myc-His.

- 5 FIG. 3: Muestra una gráfica representativa de un ensayo de competición FACS de concentraciones de CA 125/0772P desprendido con respecto al porcentaje de células positivas para, en este caso, el anticuerpo 117.1 y el control de anticuerpo M11 (cuadrados). Tal como se muestra, el M11 se puede hacer competir por unirse a células OVCAR-3 incluso con bajas concentraciones de CA 125/0772P desprendido ($IC_{50} = 0,003$ mg/ml) mientras que el 117.1 no se puede hacer competir, ni siquiera con concentraciones altas de CA 125/0772P desprendido (IC_{50} mayor que 1 mg/ml).
- 10 FIG. 4: Muestra una gráfica representativa de un ensayo de ADCC del porcentaje de lisis con respecto a la concentración de anticuerpos para el anticuerpo 117.1 (media de 4 donantes independientes). Tal como se muestra en la figura, el anticuerpo 117.1 media la lisis específica de células OVCAR-3 de una manera dependiente de la dosis.
- 15 FIG. 5A: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:35) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 117.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 5B: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:36) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 117.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- 20 FIG. 5C: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:27) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 117.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 5D: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:28) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 117.1. La secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- 25 FIG. 6A: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:37) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 368.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 6B: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:38) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 368.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- 30 FIG. 6C: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:29) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 368.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 6D: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:30) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 368.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- 35 FIG. 7A: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:39) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 501.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 7B: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:40) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 501.1. La secuencia nucleotídica que codifica secuencias líderes tiene un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- 40 FIG. 7C: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:31) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 501.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 7D: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:32) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 501.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- 45 FIG. 8A: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:41) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 776.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- 50 FIG. 8B: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:42) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 776.1. Las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias líderes tienen un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 8C: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:33) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 776.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

5 FIG. 8D: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:34) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 776.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 9A: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:52) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 725.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

10 FIG. 9B: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:57) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 725.1. Las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias líderes tienen un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

15 FIG. 9C: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:54) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 725.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 9D: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:53) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 725.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

20 FIG. 10A: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:59) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 16H9. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 10B: Representa la secuencia nucleotídica (ID SEC N.º:58) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 16H9. Las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias líderes tienen un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

25 FIG. 10C: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:56) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 16H9. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

30 FIG. 10D: Representa la secuencia de aminoácidos (ID SEC N.º:55) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 16H9. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

35 FIG. 11: Representa los resultados de un análisis de western blot de sobrenadantes de OVCAR-3. En el ejemplo práctico que se presenta posteriormente en la Sección 6.7 se indican la concentración y la detección de anticuerpos. "3 Rpt Ptn" en cada transferencia (*blot*) se refiere a calles que contienen polipéptido recombinante de 3 repeticiones 0772P; el resto de las calles en cada transferencia contiene medios condicionados por OVCAR-3 o de control. El anticuerpo particular sometido a prueba se indica en la parte inferior de cada transferencia (es decir, anticuerpos M11, OC125, 776.1 y 368.1). A la izquierda de la figura se indican marcadores de peso molecular.

40 FIG. 12: Evaluación in vivo de 776.1 marcado con ¹³¹I. Ratones nu/nu NCR portadores de tumores OVCAR-3 fueron tratados con una de las siguientes opciones: solución salina, 100 µCi de [¹³¹I]776.1 IgG1, 300 µCi de [¹³¹I]776.1 IgG1, ó 17 µg de 776.1 IgG1 no marcado (misma dosis de proteína que en el grupo de 300 µCi de [¹³¹I]776.1 IgG1). El tratamiento fue una única dosis administrada por vía intravenosa en el día 0. La actividad específica del [¹³¹I]776.1 fue 15 mCi/mg con una inmunorreactividad del 51 % post-marcado. Los resultados se muestran como volumen medio del tumor +/-SD para un total de 10 ratones por grupo. El tamaño medio del tumor en el comienzo del tratamiento fue de 199 mm³ para todos los grupos.

5. Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se basa, en parte, en el reconocimiento de que los acontecimientos que producen CA 125/0772P desprendido dejan también una parte de la región extracelular de la secuencia de aminoácidos de CA 125/0772P en una forma asociada a células, es decir, producen también CA 125/0772P asociado a células. La invención descrita de forma detallada en el presente documento se basa, en parte, en el reconocimiento de que se pueden generar anticuerpos, y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión y análogos
50 que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido, y de que dichos anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión y análogos se pueden utilizar, por ejemplo, para prevenir, gestionar, tratar, o mejorar un trastorno relacionado con el CA 125/0772P o uno o más síntomas de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P, tal como un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario.

Tal como se describe durante todo el documento, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención son aquellos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células como se define en las reivindicaciones. De modo similar, los polipéptidos de fusión y análogos de la invención se unen también preferentemente al CA 125/0772P asociado a células como se define en las reivindicaciones. Tal como también se indica en el presente documento, debido al hecho de que hay presente CA 125/0772P asociado a células, antes del desprendimiento del CA 125/0772P, como parte del CA 125/0772P pre-desprendido, se observa que anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptidos de fusión de la invención también se pueden unir a CA 125/0772P pre-desprendido. De este modo, aunque no se pretende limitarse a ningún mecanismo particular o teoría del mismo, se observa que los métodos descritos en esta sección se pueden lograr mediante la unión del anticuerpo, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptidos de fusión administrados de la invención a CA 125/0772P pre-desprendido además, o en lugar, de su unión a CA 125/0772P asociado a células.

5.1 Anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une preferentemente a un polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto al polipéptido CA 125/0772P desprendido como se define en las reivindicaciones. Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención son útiles para una variedad de fines terapéuticos, profilácticos, diagnósticos y de purificación, según se describe en el presente documento.

En una realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción es aquel que se une al ID SEC N.º:1 ó al ID SEC N.º:2 y que se une preferentemente al CA 125/0772P asociado a células. En una realización particular de este tipo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención se une a la región no repetitiva representada en ID SEC N.º:1 ó ID SEC N.º:2. En otra realización de este tipo, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción se une a una región repetitiva representada en ID SEC N.º:1 ó ID SEC N.º:2.

En una primera realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención presenta, en un Ensayo de Competición ELISA, menos que aproximadamente un 25 %, menos que aproximadamente un 20 %, menos que aproximadamente un 15 %, menos que aproximadamente un 10 %, o menos que aproximadamente un 5 % de inhibición de la unión al péptido de la Figura 1 en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/0772P desprendido con respecto al péptido de la Figura 1. En una segunda realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención presenta, en un Ensayo de Competición por Citometría de Flujo, una IC_{50} , según se mide por el porcentaje de células positivas, de por lo menos aproximadamente 0,05 mg/ml, por lo menos aproximadamente 0,1 mg/ml, por lo menos aproximadamente 0,25 mg/ml, por lo menos aproximadamente 0,5 mg/ml, por lo menos aproximadamente 0,75 mg/ml, o por lo menos aproximadamente 1,0 mg/ml de CA 125/0772P desprendido. En una tercera realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción se une al péptido de la Figura 1, pero no se une de manera detectable al polipéptido CA 125/0772P desprendido. Un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que satisface una cualquiera de estas tres realizaciones constituye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente al polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto al polipéptido CA 125/0772P desprendido según la descripción. En la invención, la segunda realización es obligatoria.

Entre los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción se encuentran anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen al péptido de la Figura 1 (ID SEC N.º:1) con una K_d menor que aproximadamente 100 nM, menor que aproximadamente 10 nM, menor que aproximadamente 1 nM, menor que aproximadamente 100 pM, o menor que aproximadamente 10 pM según se mide mediante el Ensayo de Afinidad BIAcore, que se describe posteriormente en el presente documento en la Sección 6.4.

Entre las realizaciones preferidas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción se encuentran anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que median la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC. Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos incluyen, por ejemplo, aquellos que median por lo menos aproximadamente un 10 %, por lo menos aproximadamente un 20 %, por lo menos aproximadamente un 30 %, por lo menos aproximadamente un 40 % ó por lo menos aproximadamente un 50 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 50:1 y con una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median por lo menos aproximadamente un 10 %, por lo menos aproximadamente un 20 %, por lo menos aproximadamente un 30 %, por lo menos aproximadamente un 40 % ó por lo menos aproximadamente un 50 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 25:1 y con una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median por lo menos aproximadamente un 10 %, por lo menos aproximadamente un 20 %, por lo menos aproximadamente un 30 %, por lo menos aproximadamente un 40 % ó por lo menos aproximadamente un 50 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 12,5:1 y con una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median por lo menos aproximadamente un 10 %, por lo menos aproximadamente un 20 %, por lo menos aproximadamente un 30 %, por lo menos aproximadamente un 40 % ó por lo menos aproximadamente un 50 % de lisis de células tumorales para el CA 125/0772P positivo en un ensayo de ADCC con una relación de

efector:diana 12,5:1 y con una concentración de 0,5 µg de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; o que median por lo menos aproximadamente un 10 %, por lo menos aproximadamente un 20 %, por lo menos aproximadamente un 30 %, por lo menos aproximadamente un 40 %, o por lo menos aproximadamente un 50 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 12,5:1 y con una concentración de 50 ng de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml.

Realizaciones preferidas de la descripción incluyen también anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que median la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P en un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos incluyen, por ejemplo, aquellos que median la lisis en un intervalo de entre aproximadamente un 15 % de lisis a 5 µg/ml y aproximadamente un 95 % de lisis a 0,1 µg/ml.

Realizaciones preferidas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención incluyen también anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que inhiben el crecimiento tumoral positivo para el CA 125/0772P. Por ejemplo, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos son aquellos que, preferentemente, inhiben el crecimiento tumoral positivo para el CA 125/0772P en modelos animales tales como los descritos en Eur. J. Cancer. 30A(2):183-187 (1994), de Treskes et al.; Oncol. Res. 11(6):273-280 (1999), de Ahmad et al.; e Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 38(2) :419-428 (1997), de Kievit et al., y el modelo animal de tumor por xenoinjerto de OVCAR-3 descrito posteriormente en la Sección 6.8.

En una realización particular, un anticuerpo de la descripción es un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4B7 (n.º de Accesoión ATCC® PTA-5109), o por el hibridoma 7A11 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5110), o por el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5111), o por el hibridoma 7F10 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5112), o por el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5245), o por el hibridoma 7H1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5114), o por el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5115), o por el hibridoma 8B5 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5116), o por el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5246), o por el hibridoma 8E3 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5118), o por el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5119), o por el hibridoma 15C9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5106), o por el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5107), o por el hibridoma 16H9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5180), o por el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4567), o por el hibridoma 325.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5120), o por el hibridoma 36S.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4568), o por el hibridoma 446.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5549), o por el hibridoma 501.01 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4569), o por el hibridoma 621.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5121), o por el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5122), o por el hibridoma 654.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5247), o por el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5124), o por el hibridoma 776.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4570).

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que compite con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC® PTA-5109), o por el hibridoma 7A11 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5110), o por el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5111), o por el hibridoma 7F10 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5112), o por el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5245), o por el hibridoma 7H1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5114), o por el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5115), o por el hibridoma 8B5 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5116), o por el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5246), o por el hibridoma 8E3 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5118), o por el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5119), o por el hibridoma 15C9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5106), o por el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5107), o por el hibridoma 16H9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5108), o por el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4567), o por el hibridoma 325.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5120), o por el hibridoma 368.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4568), o por el hibridoma 446.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5549), o por el hibridoma 501.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4569), o por el hibridoma 621.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5121), o por el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5122), o por el hibridoma 654.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5247), o por el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5124), o por el hibridoma 776.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4570) para unirse a CA 125/0772P asociado a células. Se considera que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la descripción compiten por unirse si compiten por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA y/o un Ensayo de Competición Cruzada FACS. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compite por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA o un Ensayo de Competición Cruzada FACS si la IC₅₀ para el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos. En una realización preferida, la IC₅₀ del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 10 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de unión a antígenos. En una realización más preferida, la IC₅₀ del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor no es mayor que un valor aproximadamente equimolar con la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:27 (117.1L). Aún en otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:28 (117.1H). Todavía en otra realización particular, un

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:31 (501.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:28 (117.1H), ID SEC N.º:30 (368.1H), ID SEC N.º:34 (776.1H), ID SEC N.º:53 (725.1H), o ID SEC N.º:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:33 (776.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:28 (117.1H), ID SEC N.º:30 (368.1H), ID SEC N.º:32 (501.1H), ID SEC N.º:53 (725.1H), o ID SEC N.º:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:54 (725.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:30 (368.1H), ID SEC N.º:32 (501.1H), ID SEC N.º:34 (776.1H), ID SEC N.º:53 (725.1H), o ID SEC N.º:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:33 (16H9L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en ID SEC N.º:30 (368.1H), ID SEC N.º:32 (501.1H), ID SEC N.º:34 (776.1H), ID SEC N.º:53 (725.1H), o ID SEC N.º:55 (16H9H).

En una realización particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer puede comprender una región de cadena ligera variable que comprende una, dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6. En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer puede comprender una región de cadena pesada variable que comprende uno, dos o tres CRDs VH cualesquiera representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6. Aún en otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer puede comprender una región de cadena ligera variable que comprende uno, dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6 y una región de cadena pesada variable que comprende una, dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6.

En una realización preferida, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer puede comprender una región de cadena ligera variable que comprende dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 1; o dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 2; o dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 3; o dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 4; o dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 5; o dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 6. En otra realización preferida, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer puede comprender una región de cadena pesada variable que comprende dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 1; o dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 2; o dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 3; o dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 4; o dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 5; o dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 6.

Aún en otra realización preferida, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer puede comprender una región de cadena ligera variable y una región de cadena pesada variable, comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 1 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 1; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 2 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 2; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 3 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 3; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 4 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 4; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 5 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 5; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDRs VL cualesquiera representadas en la Tabla 6 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDRs VH cualesquiera representadas en la Tabla 6.

Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos puede comprender un dominio VL1 que comprende cualquiera de las CDRs VL1 representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos puede comprender un dominio VL2 que comprende cualquiera de las CDRs VL2 representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6; o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos puede comprender un dominio VL3 que

comprende cualquiera de las CDRs VL3 representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos puede comprender un dominio VL1 y un dominio VL2 que comprenden cualquiera de las CDRs VL1 y las CDRs VL2 representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos puede comprender un dominio VL1 y un dominio VL3 que comprende cualquiera de las CDRs VL1 y las CDRs VL3 representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos puede comprender un dominio VL2 y un dominio VL3 que comprende cualquiera de las CDRs VL2 y las CDRs VL3 representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6; y un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos puede comprender un dominio VL1, un dominio VL2, y un dominio VL3 que comprenden cualquiera de las CDRs VL1, las CDRs VL2, y las CDRs VL3 representadas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6.

TABLA 1

Secuencias CDR de 117.1

CDR	Secuencia	ID SEC N.º:
VH1	GFSLTPGMGVG	3
VH2	HIWWDDFKRDNP ALKS	4
VH3	VDGNFLSWYFDV	5
VL1	RSSQSLVHSNGNTYLH	6
VL2	KVSNRFS	7
VL3	SQSRYVPET	8

TABLA 2

Secuencias CDR de 368.1

CDR	Secuencia	ID SEC N.º:
VH1	GYSFTGFYMH	9
VH2	YVSCYTGATTYQKFKG	10
VH3	EGDYYSMDF	11
VL1	RSSQSLERTNGNTYLH	12
VL2	KVSSRFS	13
VL3	SQTTHGPPT	14

TABLA 3

Secuencias CDR de 501.1

CDR	Secuencia	ID SEC N.º:
VH1	GYIFTDYGMN	15
VH2	CINTYTGETIYSDDFRG	16
VH3	GNYRDAIDY	17
VL1	KASQDIKSYLS	18
VL2	YATTLAD	19
VL3	LHHDESPFT	20

TABLA 4

Secuencias CDR de 776.1

CDR	Secuencia	ID SEC N.º:
VH1	GYTFTDYNIH	21
VH2	YIYPYNGVSDYNQNF	22
VH3	RWDFGSGYYFDY	23
VL1	RASSSVIYMC	24
VL2	GTSTLAS	25
VL3	QQWSSNPFT	26

TABLA 5

Secuencias CDR de 725.1

CDR	Secuencia	ID SEC N.º:
VH1	GYSFTNYGMN	60
VH2	WINAYIGEPTY ADDFKG	61
VH3	GGNSLDF	62
VL1	RASSSVSSIH	63
VL2	ATSNLAS	64
VL3	QQWSIDPAT	65

5

TABLA 6

Secuencias CDR de 16H9

CDR	Secuencia	ID SEC N.º:
VH1	GFNIKDTYMH	66
VH2	RIDPANGNTKYDPKFQG	67
VH3	SDIYYGNPGGFAY	68
VL1	TASSSVSSSYLH	69
VL2	STSNLAS	70
VL3	HQYHRSPFT	71

10

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos dados a conocer en el presente documento no son, y en general no compiten con, anticuerpos de tipo OC125, anticuerpos de tipo M11 o el anticuerpo OV 197, según se define en Tumor Biol. 17:196:219 (1996), de Nustad et al. En una realización, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos no son, y en general no compiten con, los anticuerpos de cadena única derivados de OC 125 ó derivados de VK-8 descrito en el documento WO 03/076465.

15

Los anticuerpos pueden incluir, aunque no se limitan a los mismos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos bi-específicos, anticuerpo tri-específicos, anticuerpos multi-específicos, anticuerpos de cadena única, Fvs con enlaces disulfuro, Fvs de cadena única, o anticuerpos anti-idiotipo. En una realización preferida, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal que se une preferentemente al polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto al

polipéptido CA 125/0772P desprendido. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de CA 125/0772P asociado a células o pueden ser específicos tanto para un epítomo de CA 125/0772P asociado a células como para un epítomo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, J. Immunol. 147(1):60-69 (1991), de Tutt et al.; J. Immunol. 148(5):1.547-1.553 (1992), de Kostelny et al.; y las patentes U.S. n.º 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920, 5.601.819, 5.798.229, 5.855.866, 5.869.620, 5.897.861, 5.959.084, 6.106.833, 6.248.332, 6.258.358, 6.303.755, y 6.420.140.

Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos dados a conocer pueden incluir, aunque sin limitarse a los mismos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos que contienen polipéptido de cadena ligera variable (VL), fragmentos que contienen polipéptido de cadena pesada variable (VH), o fragmentos que contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR).

Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos descritos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser anticuerpos de clase IgG, IgM, IgB, IgD, IgA ó IgY. Los anticuerpos pueden ser también de cualquier isotipo. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser de un isotipo de cadena pesada IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ ó IgA₂. Preferentemente un anticuerpo es de un tipo IgG₁.

Todavía adicionalmente, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, pueden comprender una o más CDRs, por ejemplo, secuencias de CDR según se describe en el presente documento, insertadas dentro de regiones estructurales que se produzcan de forma natural o de consenso, preferentemente regiones estructurales humanas. Además, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos pueden comprender una cadena ligera variable, por ejemplo, una región variable de cadena ligera κ ó α, y/o una cadena pesada variable según se describe en el presente documento, insertada dentro de regiones estructurales que se produzcan de forma natural o de consenso, preferentemente regiones estructurales humanas. Dichas regiones estructurales son bien conocidas para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, pueden comprender una región constante C_γ1 ó una región constante C_γ4.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente al CA 125/0772P asociado a células pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves, por ejemplo, pollos, y mamíferos, incluyendo no primates (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un caballo, un burro, una cabra, un camello, un gato, un perro, una cobaya, una rata, un ratón, una oveja) y primates (por ejemplo, un mono, tal como un mono cynomolgus, un gorila, un chimpancé, y un humano). Preferentemente, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente al CA 125/0772P asociado a células son anticuerpos quiméricos, humanos, o humanizados, que incluyen anticuerpos monoclonales, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos. Tal como se usan en el presente documento, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos "humanos" incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de ratones que expresan anticuerpos de genes humanos.

En otro aspecto, la presente exposición proporciona células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal según se da a conocer. En una realización, un hibridoma puede ser un hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5109), el hibridoma 7A11 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5110), el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5111), el hibridoma 7F10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5112), el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5245), el hibridoma 7H1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5114), el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5115), el hibridoma 8B5 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5116), el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5246), el hibridoma 8E3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5118), el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5119), el hibridoma 15C9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5106), el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5107), el hibridoma 16H9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5108), el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4567), el hibridoma 325.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5120), el hibridoma 368.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4568), el hibridoma 446.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5549), el hibridoma 501.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4569), el hibridoma 621.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5121), el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5122), el hibridoma 654.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5247), el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5124), o el hibridoma 776.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4570).

En otra realización, un hibridoma puede ser un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales que compiten con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5109), el hibridoma 7A11 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5110), el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5111), el hibridoma 7F10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5112), el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5245), el hibridoma 7H1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5114), el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5115), el hibridoma 8B5 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5116), el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5246), el hibridoma 8E3 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5118), el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5119), el hibridoma 15C9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5106), el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5107), el hibridoma 16H9 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5108), el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4567), el hibridoma 325.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5120), el hibridoma 368.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4568), el hibridoma 446.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5549), el hibridoma 501.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-4569), el hibridoma 621.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5121), el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC[®] PTA-5122), el hibridoma 654.1 (N.º de

Accesión ATCC® PTA-5247), el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5124), o el hibridoma 776.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4570) para unirse a CA 125/0772P asociado a células.

5.2 Polipéptidos de fusión

5 En otro aspecto, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, es decir, uno que se une preferentemente a polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido, enlazado operativamente a un agente heterólogo. Los polipéptidos de fusión también se unen preferentemente al CA 125/0772P asociado a células. En una realización, un polipéptido de fusión, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, y el agente heterólogo pueden estar enlazados operativamente a través de una unión covalente, tal como un enlace peptídico o una unión disulfuro.

10 En otra realización de un polipéptido de fusión de la invención, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, y el agente heterólogo pueden estar enlazados operativamente a través de una unión no covalente. El agente heterólogo puede estar enlazado al extremo amino, el extremo carboxilo, o en cualquier punto a lo largo de la secuencia contigua de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos. No es necesario que el enlace operativo se produzca directamente entre el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos y el agente heterólogo, sino que se puede producir, por ejemplo, a través de un agente o secuencia enlazador o separador.

15

El agente heterólogo puede comprender una secuencia de aminoácidos o un radioisótopo. El agente heterólogo del polipéptido de fusión puede comprender un agente citotóxico o un agente detectable.

20 Los polipéptidos de fusión se pueden usar, por ejemplo, en la generación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención. Alternativamente, se pueden utilizar polipéptidos de fusión como parte de los métodos de prevención o tratamiento descritos en el presente documento. Todavía adicionalmente, se pueden utilizar polipéptidos de fusión de la invención como parte de inmunoensayos y métodos de purificación *in vivo* e *in vitro* usando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la publicación PCT número WO 93/21232; las patentes U.S. n.º 5.314.995, 5.474.981, 5.514.558, 6.362.317, y 6.403.769; Immunol. Lett. 39(1):91-99 (1993), de Nakamura et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89(4):1428-1432 (1992), de Gillies et al.; y J. Immunol. 146(7):2446-2452 (1991), de Fell et al.

25

En casos en los que el agente heterólogo es un polipéptido, el polipéptido heterólogo es en general por lo menos aproximadamente 5, por lo menos aproximadamente 10, por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 30, por lo menos aproximadamente 40, por lo menos aproximadamente 50, por lo menos aproximadamente 60, por lo menos aproximadamente 70, por lo menos aproximadamente 80, por lo menos aproximadamente 90, o por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos.

30

En una realización, los polipéptidos de fusión comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, enlazado operativamente a un agente heterólogo que proporciona un potencial beneficio terapéutico. Por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígenos que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, se puede enlazar operativamente a una fracción terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente, o un ión radioactivo, por ejemplo, emisores alfa. Véanse, por ejemplo, las patentes U. S. n.º 5.624.827, 5.643.573, 5.789.554, 5.824.782, 5.994.151, 6.042.829, 6.074.644, 6.099.842, 6.132.722, 6.187.287, 6.197.299 y 6.207.805. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para el crecimiento celular o la viabilidad celular. Los ejemplos de una citotoxina o agente citotóxico incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Otros agentes que tienen un potencial beneficio terapéutico incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloroetamina, tioepa clorambucil, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramcina (AMC)), maitansinoides y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina) y material radioactivo, incluyendo, aunque sin limitarse a los mismos, bismuto (²¹³Bi), carbono (¹⁴C), cromo (⁵¹Cr), cobalto (⁵⁷Co), flúor (¹⁸F), gadolinio (¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), germanio (⁶⁸Ge), holmio (¹⁶⁶Ho), indio (¹⁵⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), lantano (¹⁴⁰La), lutecio (¹⁷⁷Lu), manganeso (⁵⁴Mn), molibdeno (⁹⁹Mo), paladio (103Pd), fósforo (³²P), praseodimio (¹⁴²Pr), prometio (¹⁴⁹Pm), renio (¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), rodio (¹⁰⁵Rh), runetio (⁹⁷Ru), samario (¹⁵³Sm), escandio (¹⁴⁷Sc), selenio (⁷⁵Se), estroncio (⁸⁵Sr), azufre (³⁵S), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), estaño (¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), tritio (³H), xenón (¹³³Xe); iterbio (¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb), itrio (⁹⁰Y), y cinc (⁶⁵Zn).

35

40

45

50

55

Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se puede conjugar a un agente terapéutico o fracción farmacológica. Los agentes terapéuticos o fracciones de fármaco no deben considerarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como

60

5 abrina, ricina a, exotoxina de sedomonas (es decir, PE-40), o toxina diftérica, ricina, gelonina, y proteína antiviral de fitolaca (*pokeweed*), una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferones incluyendo, aunque sin limitarse a los mismos, interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF- α TNF- β , AIM I según se da a conocer en la publicación PCT n.º WO 97/33899), AIM II (véase la Publicación PCT n.º WO 97/34911), un ligando Fas (Takahashi et al., J. Immunol., 6:1567-1574, 1994), y VEGI (Publicación PCT n.º WO 99/23105), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico (por ejemplo, antistatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una limfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulante de colonias de macrófagos ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")); proteasas, o ribonucleasas.

10 Se pueden usar, alternativamente, polipéptidos de fusión en términos diagnósticos para, por ejemplo, monitorizar la evolución de avance del cáncer o tumor como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado, tal como cuando el anticuerpo está acoplado a un agente detectable. Entre los ejemplos de agentes detectables se incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. El agente detectable puede estar acoplado o conjugado o bien directamente al anticuerpo o bien indirectamente, a través de un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.º 4.741.900, 5.693.764, 5.776.095, 6.008.002, 6.013.531, 6.110.750, 6.124.105, 6.197.523, y 6.225.050.

15 Entre los ejemplos no limitativos de enzimas adecuadas que se pueden conjugar a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se incluyen 8-lactamasas, 8-galactosidasas, fosfatasas, peroxidadas, reductasas, esterases, hidrolasas, isomerasas y proteasas, tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; entre los ejemplos no limitativos de complejos de grupos prostéticos adecuados se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Entre los ejemplos no limitativos de materiales fluorescentes adecuados se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacilamina fluoresceína, proteína verde fluorescente, proteína roja fluorescente, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo no limitativo de un material luminiscente incluye luminol. Entre los ejemplos no limitativos de materiales bioluminiscentes se incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o ^{90}Y .

20 La presente exposición abarca también anticuerpos o fragmentos de los mismos de unión a antígenos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células fusionado a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. Por ejemplo, una secuencia marcadora de aminoácidos puede ser un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86(3):821-824 (1989), por ejemplo, la histidina, por ejemplo, hexa-histidina, proporciona una purificación adecuada de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, la etiqueta hemaglutinina "HA", que se corresponde con un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson et al., Cell. 37(3):767-778 (1984)) y la etiqueta "bandera" (Brizzard et al., Biotechniques. 16(4):730-735 (1994)). Preferentemente, dichas etiquetas o secuencias marcadoras se escinden del polipéptido de fusión antes del uso, por ejemplo, uso como parte de un método terapéutico.

25 Un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígenos que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células también, por ejemplo, puede enlazarse operativamente a un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado según se describe en la patente U.S. n.º 4.676.980.

30 Las técnicas para enlazar operativamente fracciones anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., eds., Alan R. Liss, Inc. (1985) en las páginas 243 a 256; Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al., eds., Marcel Dekker, Inc. (1987) en las páginas 623 a 653; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., eds., Editrice Kurtis (1985) en las páginas 475 a 506; Order et al., "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al., eds., Academic Press (1985) en las páginas 303 a 316; Thorpe et al., Immunol. Rev. 62:119-158 (1982); y las patentes U.S. n.º 5.639.879, 5.744.119, 5.773.001, y 6.441.163.

35 Los métodos para fusionar o conjugar polipéptidos a las regiones constantes de anticuerpos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.648.218, 5.723.125, 5.783.181, 5.908.626, 5.844.095, 5.112.946, 6.030.613, 6.086.875, 6.194.177, 6.238.667, 6.262.026, y 6.277.375; los documentos EP 307.434; EP 367.166; EP 394.827; la publicación PCT WO 91/06570; Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(23):10535-10539 (1991), Traunecker et al., Nature. 331(6151):84-86

(1988); Zheng et al., J. Immunol. 154(0):5590-5600 (1995) y Vie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89(23):11337-11341 (1992).

5.3 Análogos

5 Entre los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, y polipéptidos de fusión se incluyen también
 10 análogos de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, y de polipéptidos de fusión que se
 unen preferentemente al CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido, según se
 define en las reivindicaciones. Por ejemplo, entre los análogos dados a conocer se encuentran análogos del
 anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC® PTA-5109), el hibridoma 7A11 (N.º
 de Accesoión ATCC® PTA-5110), el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5111), el hibridoma 7F10 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5112), el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5245), el hibridoma 7H1 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5114), el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5115), el hibridoma 8B5 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5116), el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5246), el hibridoma 8E3 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5118), el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5119), el hibridoma 15C9 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5106), el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5107), el hibridoma 16H9 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5108), el hibridoma 117.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4567), el hibridoma 325.1 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5120), el hibridoma 368.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4568), el hibridoma 446.1 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5549), el hibridoma 501.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-4569), el hibridoma 621.1 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5121), el hibridoma 633.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5122), el hibridoma 654.1 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5247), el hibridoma 725.1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5124), el hibridoma 776.1 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-4570), o análogos de fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de los mismos.

Un análogo de este tipo posee por lo menos una de las siguientes características estructurales: (a) una secuencia de
 aminoácidos que es preferentemente por lo menos aproximadamente un 30 %, por lo menos aproximadamente un
 35 %, por lo menos aproximadamente un 40 %, por lo menos aproximadamente un 45 %, por lo menos
 aproximadamente un 50 %, por lo menos aproximadamente un 55 %, por lo menos aproximadamente un 60 %, por
 lo menos aproximadamente un 65 %, por lo menos aproximadamente un 70 %, por lo menos aproximadamente un
 75 %, por lo menos aproximadamente un 80 %, por lo menos aproximadamente un 85 %, por lo menos
 aproximadamente un 90 %, por lo menos aproximadamente un 95 % ó por lo menos aproximadamente un 99 %
 idéntica a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, o polipéptido
 de fusión pre-modificado; (b) está codificado por una secuencia nucleotídica que hibrida bajo condiciones estrictas al
 complemento de una secuencia nucleotídica que codifica por lo menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, por lo
 menos aproximadamente 10 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 15 residuos de
 aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 20 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos
 aproximadamente 25 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 40 residuos de
 aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 50 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos
 aproximadamente 60 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 70 residuos de
 aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 80 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos
 aproximadamente 90 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 100 residuos de
 aminoácidos contiguos, por lo menos aproximadamente 110 residuos de aminoácidos contiguos, o por lo menos
 aproximadamente 120 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo,
 fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, o polipéptido de fusión pre-modificado; o (c) está codificado por una
 secuencia nucleotídica que es por lo menos aproximadamente un 30 %, por lo menos aproximadamente un 35 %,
 por lo menos aproximadamente un 40 %, por lo menos aproximadamente un 45 %, por lo menos aproximadamente
 un 50 %, por lo menos aproximadamente un 55 %, por lo menos aproximadamente un 60 %, por lo menos
 aproximadamente un 65 %, por lo menos aproximadamente un 70 %, por lo menos aproximadamente un 75 %, por
 lo menos aproximadamente un 80 %, por lo menos aproximadamente un 85 %, por lo menos aproximadamente un
 90 %, por lo menos aproximadamente un 95 % o por lo menos aproximadamente un 99 % idéntica a la secuencia
 nucleotídica que codifica el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, o polipéptido de fusión
 pre-modificado.

En una realización específica, un análogo de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, o
 polipéptido de fusión que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, comprende una secuencia de
 aminoácidos que es preferentemente por lo menos aproximadamente un 35 %, por lo menos aproximadamente un
 40 %, por lo menos aproximadamente un 45 %, por lo menos aproximadamente un 50 %, por lo menos
 aproximadamente un 55 %, por lo menos aproximadamente un 60 %, por lo menos aproximadamente un 65 %, por
 lo menos aproximadamente un 70 %, por lo menos aproximadamente un 75 %, por lo menos aproximadamente un
 80 %, por lo menos aproximadamente un 85 %, por lo menos aproximadamente un 90 %, por lo menos
 aproximadamente un 95 %, o por lo menos aproximadamente un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del
 anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (n.º de Accesoión ATCC® PTA-5109), el hibridoma 7A11 (N.º
 de Accesoión ATCC® PTA-5110), el hibridoma 7C6 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5111), el hibridoma 7F10 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5112), el hibridoma 7G10 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5245), el hibridoma 7H1 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5114), el hibridoma 8A1 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5115), el hibridoma 8B5 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5116), el hibridoma 8C3 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5246), el hibridoma 8E3 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5118), el hibridoma 8G9 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5119), el hibridoma 15C9 (N.º de
 Accesoión ATCC® PTA-5106), el hibridoma 16C7 (N.º de Accesoión ATCC® PTA-5107), el hibridoma 16H9 (N.º de

5 Accesión ATCC[®] PTA-5108), el hibridoma 117.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-4567), el hibridoma 325.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-5120), el hibridoma 368.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-4568), el hibridoma 446.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-5549), el hibridoma 501.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-4569), el hibridoma 621.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-5121), el hibridoma 633.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-5122), el hibridoma 654.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-5247), el hibridoma 725.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-5124), o el hibridoma 776.1 (N.º de Accesión ATCC[®] PTA-4570).

10 Preferentemente, los análogos incluyen menos que aproximadamente 25, menos que aproximadamente 20, menos que aproximadamente 15, menos que aproximadamente 10, menos que aproximadamente 5, menos que aproximadamente 4, menos que aproximadamente 3, o menos que aproximadamente 2 sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos, o combinaciones de las mismas, con respecto a la molécula original. En una realización preferida, los análogos presentan sustituciones de aminoácidos conservadoras realizadas en uno o más residuos de aminoácidos de los que se predice que son no esenciales (es decir, residuos de aminoácidos que no son críticos para que el anticuerpo se una de manera específica y preferente al CA 125/0772P asociado a células). Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en la que el residuo de aminoácido se sustituye con un residuo, mimético o análogo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga o polaridad similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, quirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

25 Por otra parte, los análogos pueden incluir adiciones y/o generarse, por lo menos en parte, a partir de supresiones con respecto a la molécula original. Las adiciones y/o supresiones pueden ser de cualquier identidad o combinación siempre que se cumplan los criterios estructurales para análogos de la invención antes expuestos.

30 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines de lograr una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para lograr una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). A continuación, los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % identidad = número de posiciones de solapamiento idénticas/número total de posiciones x 100 %). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

40 La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también se puede lograr usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87(6):2264-2268 (1990), según se modificó en Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90(12):5873-5877 (1993). Dicho algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410 (1990). Las búsquedas de nucleótidos en el BLAST se pueden realizar con los parámetros del programa de nucleótidos BLASTN fijados, por ejemplo, para puntuación = 100, longitud de palabra = 12 con el fin de obtener secuencias nucleotídicas homólogas a moléculas de ácido nucleico de la presente descripción. Las búsquedas de proteínas en el BLAST se pueden realizar con los parámetros del programa BLASTX fijados, por ejemplo, a puntuación = 50, longitud de palabras = 3 con el fin de obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente descripción. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede utilizar el Gapped BLAST (BLAST con huecos) según se describe en Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 (1997). Alternativamente, se puede usar el PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterativa que detecte relaciones distantes entre moléculas (*Id.*). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, de BLASTX y BLASTN). Otro ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (Myers et al., Comput. Appl. Biosci. 4(1):11-17 (1988)). Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se pueden usar una tabla de residuos en peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12, y una penalización de hueco de 4.

55 El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o no huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, se cuenta típicamente solo coincidencias exactas.

60 Un análogo también se puede referir a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión de la descripción que se haya modificado mediante la fijación, por ejemplo, fijación covalente, de cualquier tipo de molécula a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos pre-modificado correspondiente, y

que se sigue uniendo preferentemente al CA 125/0772P asociado a células. Por ejemplo, y sin sentido limitativo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión se puede modificar por glicosilación, acetilación, alquilación, esterificación, lipidación, formilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etcétera. Además, un análogo puede contener uno o más aminoácidos no clásicos. Los aminoácidos no clásicos incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico (4-Abu), ácido 2-aminobutírico (2-Abu), ácido 6-aminohexanoico (Ahx), ácido 2-aminoisobutírico (2-Aib), ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como β -metil aminoácidos, $\text{C}\alpha$ -metilaminoácidos, $\text{N}\alpha$ -metilaminoácidos, y análogos de aminoácidos en general.

En una realización, un análogo presenta una afinidad aumentada para el CA 125/0772P asociado a células, con respecto a la de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión pre-modificado correspondiente. En otra realización específica, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión que se une preferentemente al CA 125/0772P asociado a células tiene una semivida sérica aumentada con respecto a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión pre-modificado correspondiente. Por ejemplo, un análogo puede presentar una semivida en un animal, preferentemente un mamífero y con la mayor preferencia humano, mayor que aproximadamente 1 día, mayor que aproximadamente 2 días, mayor que aproximadamente 3 días, mayor que aproximadamente 7 días, mayor que aproximadamente 10 días, preferentemente mayor que aproximadamente 15 días, mayor que aproximadamente 25 días, mayor que aproximadamente 30 días, mayor que aproximadamente 35 días, mayor que aproximadamente 40 días, o mayor que aproximadamente 45 días.

Para prolongar la circulación sérica de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptidos de fusión in vivo, por ejemplo, se pueden fijar moléculas poliméricas inertes tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG) a los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptidos de fusión con o sin un enlazador multifuncional o bien a través de una conjugación, específica de sitio, del PEG al extremo amino o carboxilo de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptidos de fusión o bien a través de grupos ϵ -amino presentes en residuos de lisina. Se prefiere una derivatización polimérica lineal o ramificada que dé como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se puede monitorizar de cerca mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar una conjugación correcta de moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG que no ha reaccionado se puede separar de los conjugados de PEG-anticuerpo, -fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o -polipéptido de fusión mediante exclusión de tamaño o cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptidos de fusión derivatizados con PEG se pueden someter a prueba en relación con su actividad de unión así como en relación con su eficacia in vivo usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, mediante inmunoensayos descritos en el presente documento.

También se pueden generar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que tienen una semivida incrementada *in vivo* mediante la introducción de una o más modificaciones (es decir, sustituciones, inserciones o supresiones) de aminoácidos en un dominio constante IgG, o fragmento del mismo de unión a FcRn (preferentemente un fragmento dominio Fe o Febisagra). Véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 98/23289 y la patente U.S. n.º 6.277.375.

5.4. Moléculas de ácido nucleico

Aún en otro aspecto, la presente exposición proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo de los mismos, de la exposición.

En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo de los mismos, que comprende por lo menos una, preferentemente dos o tres, de las CDRs de cadena ligera enumeradas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 ó la Tabla 6. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica de ID SEC N.º:35, ID SEC N.º:37, ID SEC N.º:39, ID SEC N.º:41, ID SEC N.º:52, o ID SEC N.º:59 que codifica por lo menos una, preferentemente dos o tres, de dichas CDRs de cadena ligera.

En otra realización, una molécula de ácido nucleico codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo de los mismos, que comprende por lo menos una, preferentemente dos o tres, de las CDRs de cadena pesada enumeradas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica de ID SEC N.º:36, ID SEC N.º:38, ID SEC N.º:40, ID SEC N.º:42, ID SEC N.º:57 ó ID SEC N.º:58 que codifica por lo menos una, preferentemente dos o tres de dichas CDRs de cadena pesada.

En otra realización, una molécula de ácido nucleico dada a conocer comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de los mismos

que comprende una secuencia polipeptídica de cadena ligera variable mostrada en la FIG. 5C, la FIG. 6C, la FIG. 7C, la FIG. 8C, la FIG. 9C ó la FIG. 10C. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia nucleotídica de ID SEC N.º:35 (117.1), ID SEC N.º:37 (368.1), ID SEC n.º:39 (501.1), ID SEC N.º: 41 (776.1), ID SEC N.º:52 (725.1) o ID SEC N.º:59 (16H9).

- 5 Aún en otra realización, una molécula de ácido nucleico dada a conocer comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de los mismos que comprende una secuencia polipeptídica de cadena pesada variable mostrada en la FIG. 5D, FIG. 6D, FIG. 7D, FIG. 8D, FIG. 9D ó FIG. 10D. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia nucleotídica de ID SEC N.º:36 (117.1), ID SEC N.º:38 (368.1), ID SEC N.º:40 (501.1), ID SEC N.º:42 (776.1), ID SEC N.º:57 (725.1) o ID SEC N.º:58 (16H9).

- 10 Entre las moléculas de ácido nucleico se encuentran moléculas de ácido nucleico que son variantes degeneradas, o que hibridan bajo condiciones estrictas al complemento de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención. Por ejemplo, en una realización, una molécula de ácido nucleico es aquella que hibrida bajo condiciones estrictas al complemento de ID SEC N.º:35, ID SEC N.º:36, ID SEC N.º:37, ID SEC N.º:38, ID SEC N.º:39, ID SEC N.º:40, ID SEC N.º:41, ID SEC N.º:42, ID SEC N.º:52, ID SEC N.º:57, ID SEC N.º:58, o ID SEC N.º:59. Preferentemente, dichas moléculas de ácido nucleico hibridantes de la invención codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer en el presente documento.

5.5. Composiciones farmacéuticas

- 20 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, un polipéptido de fusión, un análogo o una molécula de ácido nucleico según se da a conocer, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- Preferentemente, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo que presenta una K_d menor que aproximadamente 100 nM, menor que aproximadamente 10 nM, menor que aproximadamente 1 nM, menor que aproximadamente 100 pM, o menor que aproximadamente 10 pM para el péptido de la Figura 1 (ID SEC N.º:1) según se mide mediante el Ensayo de Afinidad BIAcore, tal como se describe en la Sección 6.4. Alternativamente, una composición farmacéutica puede comprender un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo o molécula de ácido nucleico de la invención que media la lisis de una célula tumoral positiva para el CA 125/0772P.
- 30 De la forma más preferente, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, análogo o una molécula de ácido nucleico dados a conocer en el presente documento que codifica un polipéptido de presenta un crecimiento tumoral positivo para el CA 125/0772P, o bien por sí mismo o bien cuando se conjuga a un agente citotóxico.

- 35 En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención, o un polipéptido de fusión o análogo de los mismos, se conjuga a un agente citotóxico útil en el tratamiento de la enfermedad proliferativa celular, tal como aquellos agentes citotóxicos mencionados en la Sección 5.2 anteriormente en el presente documento. En una realización particular, el agente citotóxico es un radioisótopo. En otra realización particular, el radioisótopo se selecciona del grupo consistente en ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{90}Y .

- El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo o incompleto)), excipiente, agente estabilizador, conservantes, aglutinante, o vehículo para la administración de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo de la invención. Los vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Como vehículos líquidos también se pueden utilizar soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Entre los excipientes farmacéuticos adecuados se incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etcétera. En *Remington: The Science & Practice of Pharmacy*, 20ª Edición, Gennaro, et., Lippincott (2000), se describen ejemplos de
- 45 vehículos farmacéuticos adecuados.

- 55 En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas son estériles y en una forma adecuada para su administración a un sujeto, preferentemente un sujeto animal, más preferentemente un sujeto mamífero, y de la forma más preferente un sujeto humano.

En una realización específica, puede resultar deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesite tratamiento. Esto se puede lograr, por ejemplo, y sin ningún sentido limitativo, mediante infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas de sialastic o fibras. Preferentemente, cuando se administran composiciones farmacéuticas, se debe tener cuidado de usar materiales en los cuales no se adsorban los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos de la composición o composiciones farmacéuticas.

En otra realización, la composición farmacéutica puede estar presente y se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase, por ejemplo, *Science* 249(4976):1527-1533 (1990), Langer; Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berest et al., eds., Liss 1989), en las páginas 353 a 365; Lopez-Berestein et al., *ibid.*, en las páginas 317 a 327; Lopez-Berestein *et al.*, *ibid.*, en general; y las patentes U.S. n.º RE35.338, 5.662.93, 5.759.519, 5.879.713, 6.027.726, 6.099.857, 6.132.764, 6.245.427, 6.284.375, 6.350.466, y 6.417.326).

Todavía en otra realización, la composición puede estar presente y se puede administrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una realización, se puede usar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véanse, por ejemplo, *Science* 249(4976):1527-1533 (1990), Langer; Sefton, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14(3):201-40 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88(4):507-516 (1980); Saudec et al., *N. Engl. J. Med.* 321(9):574-579 (1989); y las patentes U.S. n.º 5.720.720 y 6.352.683). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos para lograr una liberación controlada sostenida de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos de la descripción o fragmentos de los mismos (véanse, por ejemplo, *Medical Applications of Control Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974) *Medical Applications of Control Release*, Langer et al., eds., CRC Press (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen et al., eds., Wiley (1984); Ranger et al., *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); Levy et al., *Science* 228(4696):190-192 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25(4):351-356 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 71(1):105-112 (1989); patentes U.S. n.º 5.128.326, 5.679.377, 5.863.985, 5.912.015, 5.916.597, 5.989.463, 5.994.492, 6.011.011, 6.020.004, 6.066.325, 6.180.608, 6.190.702, 6.214.966, 6.221.958, 6.221.977, 6.267.981, 6.362.276, 6.365.173, 6.375.985, 6.394.997, y 6.399.103; y la publicación PCT n.º WO 99/20253). Entre los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA), y polioortoésteres.

Una composición farmacéutica se formula de manera que sea compatible con su vía deseada de administración. Entre los ejemplos de vías de administración se incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, por ejemplo, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intramuscular, subcutánea), oral, intranasal, inhalación, transdérmica (tópica), transmucosal, y administración rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica para seres humanos. En una realización preferida, una composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios para su administración subcutánea a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Si las composiciones farmacéuticas se van a administrar tópicamente, las composiciones se pueden formular en forma de, por ejemplo, una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión, u otra forma bien conocida para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Remington: *The Science & Practice of Pharmacy*, 20ª Edición, Gennaro, ed., Lippincott (2000). Para formas de dosificación tópicas no pulverizables, se utilizan típicamente formas de viscosas a semi-sólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica preferentemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitaciones, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, ungüentos, y similares, que, si se desea, se pueden esterilizar o mezclar con agentes auxiliares (por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones, o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones en aerosol pulverizables, en donde el ingrediente activo, preferentemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón), o en una botella comprimible. Si se desea, a las composiciones farmacéutica y las formas de dosificación se les puede adicionar también cremas hidratantes o humectantes. Los ejemplos de dichos ingredientes adicionales son bien conocidos en la materia.

Si las composiciones farmacéuticas se van a administrar por vía intranasal, las composiciones se pueden formular en forma de aerosol, en pulverización, nebulización o en forma de gotas. En particular, agentes para ser usados según la presente invención se pueden entregar de manera adecuada en forma de una presentación de pulverizador de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro más adecuado. En el

caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para entregar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador, que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

5 Si las composiciones farmacéuticas se van a administrar oralmente, las composiciones farmacéuticas se pueden formular oralmente en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, sellos, gelpcaps, soluciones, suspensiones y similares. Se pueden preparar comprimidos o cápsulas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); sustancias de carga (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes según se crea apropiado. Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de un agente(s) profiláctico o terapéutico.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multi-dosis, con un conservante adicionado. Las composiciones farmacéuticas pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formulatorios tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo se puede presentar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de su uso.

30 Las composiciones farmacéuticas también se pueden formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, las composiciones también se pueden formular como una preparación depot. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

En general, los ingredientes de composiciones farmacéuticas se suministran o bien por separado o bien mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado exento de agua en un envase sellado herméticamente tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición farmacéutica se vaya a administrar por infusión, la misma se puede dispensar con una botella de infusión que contenga solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición farmacéutica se administre por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Para anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión, y análogos de la invención, la dosificación administrada a un sujeto está generalmente entre aproximadamente 5 µg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, más preferentemente entre aproximadamente 20 µg/kg y aproximadamente 5 mg/kg del peso corporal del sujeto, de la forma más preferente entre aproximadamente 100 µg/kg y aproximadamente 5 mg/kg. La dosificación se puede administrar hasta aproximadamente 6 tratamientos durante un periodo de semanas a meses, según determine el médico a cargo de la administración. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune a los polipéptidos extraños. De este modo, frecuentemente son posibles dosificaciones menores y una administración menos frecuente de anticuerpos humanos. Además, la dosificación y frecuencia de administración de anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos se puede reducir potenciando la captación y la penetración en el tejido de los anticuerpos, mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

La dosis precisa a utilizar en la formulación dependerá también de la vía de administración, y de la gravedad de la condición, y debería decidirse de acuerdo con el criterio del profesional y las circunstancias de cada paciente teniendo en cuenta los estudios clínicos publicados. Se pueden extrapolar dosis eficaces a partir de curvas de dosis-respuesta obtenidas a partir de sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales.

Una composición farmacéutica se puede envasar en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre que indique la cantidad del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo. En otra realización, una composición farmacéutica se suministra como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente y se puede reconstituir, por ejemplo, con agua o solución salina, a la concentración adecuada, para su administración a un sujeto. Todavía en otra realización, una composición farmacéutica se suspende en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indica la cantidad y la concentración del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo.

Una composición farmacéutica se puede suministrar en un recipiente sellado herméticamente con una dosificación unitaria de por lo menos aproximadamente 5 mg, más preferentemente por lo menos aproximadamente 1 mg, más preferentemente por lo menos aproximadamente 2 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 25 mg, 35 mg, 45 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, ó 500 mg. Cuando se suministra en forma líquida, la composición farmacéutica se puede suministrar en dicho recipiente sellado en una concentración de por lo menos 1 mg/ml.

Se da a conocer también un método de preparación de una composición farmacéutica de la invención, que comprende mezclar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5.6 Artículos de fabricación

Todavía en otro aspecto, se da a conocer un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica dada a conocer en el presente documento contenida dentro del material de envasado, presentándose dicha composición farmacéutica en una forma adecuada para su administración a un sujeto, preferentemente un humano, o en un formato que se puede diluir o reconstituir para su administración al sujeto. En una realización, el artículo de fabricación puede comprender además instrucciones impresas y/o una etiqueta que oriente sobre el uso o administración de la composición farmacéutica. Las instrucciones y/o etiqueta pueden, por ejemplo, sugerir un régimen de dosificación para la prevención o tratamiento de uno o más síntomas de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P, tal como un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario, de útero, de mama o de pulmón. De este modo, las instrucciones y/o la etiqueta pueden proporcionar material de información que informe al médico, técnico o sujeto sobre cómo prevenir, gestionar, tratar o mejorar apropiadamente un trastorno relacionado con el CA 125/0772P o uno o más síntomas de dicho trastorno, por ejemplo, un trastorno proliferativo celular, tal como cáncer, por ejemplo, cáncer de ovario.

Como con cualquier producto farmacéutico, el material de envasado y el recipiente de los artículos de fabricación están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y el transporte. Más específicamente, se proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado, tal como una caja, botella, tubo, vial, recipiente, pulverizador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.), sobre y similares; y por lo menos una forma de dosificación unitaria de una composición farmacéutica de la invención, contenida dentro de dicho material de envasado.

5.7. Métodos de identificación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células

Se da a conocer también un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente al CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido. En una realización, un método para identificar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células comprende hacer entrar en contacto un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos con un péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células, en presencia de CA 125/0772P desprendido, bajo condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o bien a dicho péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células o bien al CA 125/0772P desprendido. Después de la incubación, el CA 125/0772P desprendido (con o sin anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos unido) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos no unido se retiran, y se mide la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos unido al péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos del método satisface una cualquiera de las tres realizaciones expuestas anteriormente en relación con "unión preferente", entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une preferentemente a un polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/0772P desprendido. En una realización preferida, la relación de CA 125/0772P desprendido con respecto a CA 125/0772P asociado a células en la mezcla de reacción es aproximadamente 25:1 (peso/peso). Como parte de este método, el CA 125/0772P asociado a células se puede inmovilizar en una superficie sólida. Por ejemplo, el método se puede realizar en un formato ELISA.

Se proporciona también un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, que comprende hacer entrar en contacto un anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con un péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células y CA 125/0772P desprendido (por ejemplo, aproximadamente una cantidad en exceso de 25 veces

(peso/peso)), bajo condiciones que permiten la unión del péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, retirar péptido no unido que comprende CA 125/0772P asociado a células, medir la cantidad de péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células al que se ha unido el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, y comparar la cantidad medida con la cantidad de péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células a la que se puede unir el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en ausencia de dicha cantidad de CA 125/0772P desprendido. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos del método satisface una cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con “se une preferentemente”, entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une preferentemente al polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto al polipéptido CA 125/0772P desprendido. Como parte de este método, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se puede inmovilizar en una superficie sólida, por ejemplo, el método se puede realizar en un formato ELISA. Las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, en combinación con técnicas convencionales bien conocidas para aquellos expertos en la materia, se pueden utilizar para llevar a la práctica métodos para la identificación de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, tales como los que se dan a conocer. Por ejemplo, entre los ensayos que se pueden utilizar en la identificación de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos se encuentran el Ensayo de Competición ELISA descrito en la Sección 6 y sus subsecciones posteriormente.

Se proporciona también un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, que comprende hacer entrar en contacto un anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con una célula que expresa el CA 125/0772P y con una cantidad, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 0,05 mg/ml, de CA 125/0772P desprendido bajo condiciones que permiten la unión del CA 125/0772P al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, retirar células no unidas, medir la cantidad de células que expresan el CA 125/0772P al que se ha unido el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, y comparar la cantidad medida con la cantidad de células que expresan el CA 125/0772P que se une al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en ausencia de dicha cantidad de CA 125/0772P desprendido. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos del método cumple una cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con “se une preferentemente”, entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une preferentemente al polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/0772P. Se puede realizar un método de este tipo, en el que, por ejemplo, la medición se ejecute mediante técnicas de citometría de flujo, incluyendo, por ejemplo, separación celular activada por fluorescencia. Las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, en combinación con técnicas convencionales bien conocidas por aquellos expertos en la materia, se pueden utilizar para llevar a la práctica dichos métodos para la identificación de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, de la invención. Por ejemplo, entre los ensayos que se pueden utilizar en la identificación de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos se encuentran el Ensayo de Competición por Citometría de Flujo de la Sección 6 y sus subsecciones, posteriormente.

Se proporcionan también anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células y que son específicos para CA 125/0772P. Los anticuerpos que son específicos para el CA 125/0772P se pueden identificar de manera rutinaria, por ejemplo, utilizando el Ensayo de Especificidad ELISA y el Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo descritos, por ejemplo, en la Sección 6 y sus subsecciones. Como tal, se proporcionan métodos para identificar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que son específicos para el CA 125/0772P y que también se unen preferentemente al CA 125/0772P asociado a células. En uno de dichos métodos, en primer lugar, se identifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que es específico para el CA 125/0772P, por ejemplo, utilizando un Ensayo de Especificidad ELISA y/o un Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo. A continuación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se somete a prueba en relación con una capacidad de unirse preferentemente a CA 125/0772P asociado a células utilizando, por ejemplo, uno de los métodos descritos en el presente documento.

También entre las realizaciones se encuentran anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente al CA 125/0772P asociado a células y que se unen al péptido de la Figura 1 (ID SEC N.º:1) con una K_d menor que aproximadamente 100 nM, menor que aproximadamente 10 nM, menor que aproximadamente 1 nM, menor que aproximadamente 100 pM, o menor que aproximadamente 10 pM según se mide con el Ensayo de Afinidad BIAcore, que se describe en la Sección 6.4. Dichos anticuerpos se pueden identificar de manera rutinaria, por ejemplo, adoptando el Ensayo de Afinidad ELISA descrito posteriormente en la Sección 6 y sus subsecciones. Como tales, se proporcionan los métodos para identificar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células y se unen también a CA 125/0772P asociado a células con por lo menos un cierto nivel mínimo de afinidad. En una de estas realizaciones, en primer lugar, se identifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células utilizando, por ejemplo, uno de los métodos descritos en el presente documento. A continuación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se somete a prueba en relación con una capacidad de unirse a CA 125/0772P asociado a células (a un péptido que comprende el mismo) con una K_d menor que aproximadamente 100 nM, menor que aproximadamente 10 nM, menor que

aproximadamente 1 nM, menor que aproximadamente 100 pM, o menor que aproximadamente 10 pM, utilizando, por ejemplo una de las técnicas descritas en el presente documento.

Se dan a conocer también anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células y que presentan una capacidad de mediar la lisis de células positivas para el CA 125/0772P, por ejemplo, células tumorales. Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos se pueden identificar de manera rutinaria, por ejemplo, realizando los ensayos de ADCC y/o CDC descritos posteriormente en la Sección 6 y sus subsecciones. Como tal, la presente invención proporciona métodos para identificar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células y que presentan también una capacidad de mediar la lisis de células positivas para el CA 125/0772P. En una de tales realizaciones, se puede identificar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células utilizando, por ejemplo, uno de los métodos presentados en este documento. A continuación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se somete a prueba en relación con una capacidad de mediar la lisis de células positivas para el CA 125/0772P a través de, por ejemplo, un ensayo de ADCC y/o CDC según se describe en el presente documento.

Las realizaciones de la presente descripción también incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente al CA 125/0772P y que presentan una capacidad de inhibir un crecimiento lento de tumores positivos para el CA 125/0772P. Dichos anticuerpos se pueden identificar de manera rutinaria, por ejemplo, realizando ensayos *in vivo* previamente descritos, tales como los que se encuentran en Treskes et al., Eur. J. Cancer. 30A(2):183-187 (1994); Ahmad et al., Oncol. Res. 11(6):273-280 (1999); y Kievit et al., Int. J. Radiat. Onc. Biol. Phys. 38(2):419-428 (1997). Como tales, la presente descripción también proporciona métodos para identificar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen preferentemente a CA 125/0772P y que también presentan una capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales positivas para el CA 125/0772P. En una de tales realizaciones, se puede identificar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une preferentemente al CA 125/0772P asociado a células utilizando, por ejemplo, uno de los métodos presentados en este documento. A continuación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se somete a prueba en relación con una capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales positivas para el CA 125/0772P a través de, por ejemplo, someter a prueba el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en un sistema tal como uno de los sistemas *in vivo* descritos en las citas anteriores.

5.8. Métodos de prevención, tratamiento, gestión, o mejora de un síntoma de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P

La presente exposición proporciona métodos para la prevención, el tratamiento, o la gestión de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P, o la mejora de un síntoma de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P. Por ejemplo, la presente invención proporciona métodos para la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora de un síntoma de un trastorno proliferativo celular, mediante la administración, a un sujeto que necesite dicha prevención, tratamiento, gestión, o mejora, de una cantidad de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, o análogo eficaz para producir el resultado deseado en el sujeto.

Tal como se describe durante todo el documento, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos dados a conocer son aquellos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células. De modo similar, los polipéptidos de fusión y análogos dados a conocer en el presente documento también se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células. Tal como también se indica en el presente documento, debido al hecho de que hay presente CA 125/0772P asociado a células, antes del desprendimiento del CA 125/0772P, o parte del CA 125/0772P, se observa que anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión, y análogos también se pueden unir al CA 125/0772P. De este modo, aunque no se desea ceñirse a ningún mecanismo particular o teoría del mismo, se observa que los métodos descritos en esta sección se pueden poner en práctica, por lo menos en parte, mediante la unión del anticuerpo, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos administrados para la invención a CA 125/0772P pre-desprendido además, o en lugar, de su unión a CA 125/0772P asociado a células post-desprendido.

En una realización de esta descripción, los métodos se refieren a la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora de un síntoma de un cáncer. Por ejemplo, estos métodos se refieren a la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora de un síntoma de cánceres o trastornos asociados al cáncer, incluyendo dichos cánceres, aunque sin limitarse a los mismos, cánceres tales como carcinomas, carcinomas, mielomas, leucemias, linfomas, y cánceres de tipo mixto. En una realización particular, dichos métodos se refieren a la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora del cáncer de ovario, el cáncer cervical, el cáncer de útero, el cáncer de mama o el cáncer de pulmón, o un síntoma de los mismos. En una realización preferida de tales de la invención, tales métodos se refieren a la prevención, el tratamiento, la gestión, o la mejora de un síntoma del cáncer de ovario.

En otra realización, la presente descripción proporciona también un método para tratar un trastorno relacionado con el CA 125/0772P, o mejorar un síntoma del mismo, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento o mejora, un anticuerpo, fragmento de un anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la descripción en una cantidad suficiente para tratar el trastorno proliferativo celular o mejorar un síntoma del mismo. El trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser, por ejemplo, un trastorno proliferativo celular tal

como cáncer y puede incluir, por ejemplo, cáncer de ovario, cervical, cáncer de útero, cáncer de mama o cáncer de pulmón. Dicha realización se lleva a la práctica preferentemente en los casos en los que el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la descripción se conjuga a un agente citotóxico útil en el tratamiento de la enfermedad proliferativa celular, tal como aquellos agentes mencionados en la Sección 5.2. En una realización particular, el agente citotóxico es un radioisótopo. En una realización particular adicional, el radioisótopo se puede seleccionar del grupo consistente en ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{90}Y . Tal realización se puede llevar a la práctica como parte de una terapia combinada contra el cáncer, por ejemplo, administrando adicionalmente al sujeto un agente quimioterapéutico, tal como paclitaxel o cisplatino, o un tratamiento de radiación.

Se proporciona también un método para evitar un trastorno relacionado con el CA 125/0772P o un síntoma de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicha prevención, un anticuerpo, fragmento de un anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo dados a conocer, en una cantidad suficiente para prevenir el trastorno relacionado con el CA 125/0772P, o un síntoma del mismo. El trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser, por ejemplo, un trastorno proliferativo celular tal como cáncer y puede incluir, por ejemplo, cáncer de ovario, cervical, cáncer de útero, cáncer de mama o cáncer de pulmón.

En realizaciones adicionales, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un cáncer óseo, por ejemplo, sarcoma de Ewing, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, u otro sarcoma de tejidos blandos. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un tumor cerebral, por ejemplo, oligodendroglioma, ependimoma, meningioma, linfoma, schwannoma, o meduloblastoma. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser cáncer de mama, por ejemplo, carcinoma ductal in situ de la mama. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un cáncer del sistema endocrino, por ejemplo, cánceres pancreático, de paratiroides, de pituitaria, o de tiroides. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P es un cáncer gastrointestinal, por ejemplo, cáncer anal, colorrectal, esofágico, de vesícula, gástrico, de hígado, pancreático, o de intestino delgado. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un cáncer ginecológico, por ejemplo, cáncer cervical, endometrial, de útero, de trompas de falopio, enfermedad trofoblástica gestacional, coriocarcinoma, de ovario, vaginal, o vulvar. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un cáncer de cabeza y cuello, por ejemplo, cáncer de laringe, orofaríngeo, de paratiroides o de tiroides. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un cáncer leucémico, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células peludas, o un trastorno mieloproliferativo. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P es un cáncer de pulmón, por ejemplo, un mesotelioma, un cáncer de pulmón de células no pequeñas, o un cáncer de pulmón de células pequeñas. En otra realización el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un linfoma, por ejemplo, linfoma relacionado con SIDA, linfoma cutáneo de células T, enfermedad de Hodgkin, o enfermedad no Hodgkin. En otra realización el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser cáncer metastásico. En otra realización el trastorno relacionado con el CA 125/0772P es un mieloma, por ejemplo, un mieloma múltiple. En otra realización el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser cáncer pediátrico, por ejemplo, un tumor cerebral, sarcoma de Ewing, leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda o leucemia mielógena aguda), cáncer de hígado, un linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin), neuroblastoma, retinoblastoma, un sarcoma (por ejemplo, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma u otros sarcomas de tejidos blandos), o Tumor de Wilms. En otra realización el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser cáncer de pene. En otra realización el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser cáncer de próstata. En otra realización el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un cáncer de piel, por ejemplo, linfoma cutáneo de células T, micosis fungoide, sarcoma de Kaposi, o melanoma. En otra realización el trastorno relacionado con el CA 125/0772P es cáncer testicular. En otra realización el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un cáncer de tiroides, por ejemplo, carcinoma papilar, folicular, medular, anaplásico, o de tiroides indiferenciado. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P puede ser un cáncer del tracto urinario, por ejemplo, cáncer de vejiga, de riñón, o de uretra. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/0772P o afección relacionada con el cáncer, puede ser ataxiatelangiectasia, carcinoma de origen primario desconocido, síndrome de Lee-Fraumeni, o timoma.

En una realización de dichos métodos de la descripción, se administra un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos. En otra realización, se administra un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal de unión a antígenos. Típicamente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se puede administrar con una concentración de dosificación de entre aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y aproximadamente 10 mg/kg , más preferentemente entre aproximadamente 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y aproximadamente 5 mg/kg , y de la forma más preferente entre aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y aproximadamente 5 mg/kg del peso corporal del sujeto.

En general, los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar a través de la administración de una composición farmacéutica según se da a conocer. La toxicidad y/o eficacia de las composiciones administradas según los protocolos particulares puestos en práctica se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED_{50} la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población. La relación de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$. Se prefieren composiciones que presentan índices terapéuticos elevados. Aunque se pueden usar composiciones que presentan efectos secundarios tóxicos, es preferible utilizar un sistema de aplicación que dirija dichas

composiciones al sitio del tejido afectado, por ejemplo, el tejido del ovario, reduciendo de este modo los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares y de estudios con animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación de composiciones para ser usadas en humanos. La dosificación de dichas composiciones se sitúa preferentemente dentro de un intervalo que da como resultado concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con una toxicidad pequeña o inexistente. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación utilizada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en los métodos de la descripción, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluye la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto que logra la mitad de la inhibición máxima de uno o más síntomas) según se determina en ensayos de cultivos celulares, por ejemplo, ensayos de proliferación. Dicha información se puede usar para determinar de manera más precisa dosis útiles en humanos. Se pueden medir niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Se conocen varios sistemas de aplicación y los mismos se pueden usar para administrar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo dados a conocer, por ejemplo, encapsulación en liposomas (véase, por ejemplo, Langer, *Science* 249(4976):1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein et al., eds., Liss (1989) en las páginas 353 a 365), micropartículas, microcápsulas, o células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo según se da a conocer.

Los métodos de administración de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la descripción, o composición farmacéutica que comprende los mismo, incluyen, aunque sin limitaciones, las vías de administración parenteral (por ejemplo, administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, o mucosa (por ejemplo, intranasal y oral). Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.º 5.679.377, 5.702.727, 5.783.193, 5.817.624, 6.074.689, 6.156.731, 6.174.529, 6.187.803, 6.331.175, y 6.387.406. En una realización específica, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la descripción, o una composición farmacéutica de los mismos se puede administrar por vía intramuscular, intravenosa, o subcutánea. Las composiciones se pueden administrar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etcétera) y también se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Adicionalmente, también se puede utilizar la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y una formulación con un agente aerosolizante. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.º RE37.525, 5.290.540, 5.855.913, 5.874.064, 5.934.272, 5.985.309, 5.985.320, 6.019.968, 6.165.463, 6.358.530, y 6.402.733 y la publicación PCT n.º WO 99/66903. En una realización, un anticuerpo, una proteína de fusión, una molécula conjugada, o una composición farmacéutica se pueden administrar usando la tecnología de aplicación de fármacos pulmonares Alkermes AIR™ (Alkermes, Inc., Cambridge, MA).

En una realización preferida, la composición farmacéutica se puede formular de acuerdo con procedimientos rutinarios de manera que se adapte para su administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones farmacéuticas para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

En otra realización específica, puede que resulte deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesite el tratamiento. Esto se puede lograr mediante infusión local, inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso.

Aún en otra realización, los métodos se pueden llevar a la práctica como parte de una terapia combinada, por ejemplo, una terapia combinada contra el cáncer. Dicha terapia combinada contra el cáncer puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente quimioterapéutico, por ejemplo, cisplatino, ifosfamida, paclitaxel, taxanos, un inhibidor de la topoisomerasa I (por ejemplo, CPT-11, topotecán, 9-AC, ó GG-211), gemcitabina, mitomicina, emetina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxordubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracenodiona, mitoxantrona, mitramicina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracil (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal, o taxol. Dicha terapia combinada contra el cáncer puede incluir de manera alternativa o adicional, aunque sin limitarse a la misma, terapia de radiación.

El uso de la expresión “terapia combinada” o “terapia combinada contra el cáncer” no limitan el orden en el que se administran agentes o tratamientos a un sujeto con un trastorno relacionado con el CA 125/0772P. Por ejemplo, los agentes de la terapia combinada se pueden administrar simultáneamente, secuencialmente en cualquier orden o cíclicamente a un sujeto. En una realización preferida, los dos o más componentes de la terapia combinada se administran a un sujeto simultáneamente. El término “simultáneamente” no se limita a la administración de dos o más agentes exactamente al mismo tiempo, sino que por el contrario significa que los agentes se administran a un

sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que los agentes pueden actuar juntos para proporcionar un beneficio que si se administrasen de otro modo.

Los agentes a administrar como parte de los métodos de terapia combinada se pueden administrar, por ejemplo, a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes de las terapias combinadas se pueden administrar a un sujeto en composiciones farmacéuticas independientes, por las mismas vías o vías diferentes de administración.

5.9. Métodos de diagnóstico de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona métodos para diagnosticar un trastorno relacionado con el CA 125/0772P o la predisposición a un trastorno relacionado con el CA 125/0772P. En una realización, se pueden usar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión, y análogos etiquetados de la descripción, con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar, o monitorizar un trastorno relacionado con el CA 125/0772P, tal como el cáncer.

Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión, y análogos de la descripción para someter a ensayo niveles de CA 125/0772P asociado a células, en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos según se describe en el presente documento o tal como es sabido para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101(3):976-984 (1985); Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 105(6Pt 2):3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos, útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Se conocen etiquetas de ensayo adecuadas para anticuerpos en la técnica y las mismas incluyen, por ejemplo, etiquetas enzimáticas, tales como, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa; radioisótopos tales como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{111}In), y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); etiquetas luminiscentes, tales como luminol, y etiquetas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.

Un aspecto es la detección y el diagnóstico de una predisposición al cáncer, en particular, el cáncer de ovario, en un humano. En una realización, el diagnóstico comprende:

a) administrar (por ejemplo, de manera parenteral, subcutánea, o intraperitoneal) a un sujeto una cantidad de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo etiquetado que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, eficaz para el diagnóstico, y b) detectar el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo etiquetado en el sujeto con el fin de realizar dicho diagnóstico. De acuerdo con esta realización, el anticuerpo, fragmento de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo se etiqueta preferentemente con una fracción para formación de imágenes que es detectable usando un sistema de formación de imágenes conocido para los expertos en la materia. El nivel basal se puede determinar por varios métodos, que incluyen comparar la cantidad de molécula etiquetada detectada con un valor normalizado previo determinado para un sistema particular.

La presencia de la molécula etiquetada se puede detectar en sujeto usando métodos conocidos en la técnica para exploraciones in vivo. Estos métodos dependen del tipo de etiqueta usada. Los profesionales expertos podrán determinar el método apropiado para detectar una etiqueta particular. Los métodos que se pueden usar en los métodos diagnósticos de la invención incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, tomografía computerizada (CT), exploración de cuerpo entero tal como tomografía por emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), y sonografía.

En una realización específica, la molécula se etiqueta con un radioisótopo y es detectada en el sujeto usando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (véase, por ejemplo, la patente U.S. n°. 5.441.050). En otra realización, la molécula se etiqueta con un compuesto fluorescente y se detecta en el sujeto usando un instrumento de exploración sensible a la fluorescencia. En otra realización, la molécula se etiqueta con un metal de emisor de positrones y se detecta en el sujeto usando una PET. Todavía en otra realización, la molécula se etiqueta con una etiqueta paramagnética y se detecta en el sujeto usando una MRI.

Se entenderá en la técnica que el tamaño y el peso del sujeto, así como el tipo del sistema de formación de imágenes usado, determinarán el tipo y la cantidad de la fracción formadora de imágenes necesaria para producir imágenes diagnósticas útiles. En el caso de una fracción de radioisótopo que contenga $^{99\text{m}}\text{Tc}$, para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada estará comprendida normalmente entre aproximadamente 5 y 20 milicuries. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo etiquetados se acumularán entonces preferentemente en la ubicación de células que presentan un polipéptido CA 125/0772P asociado a células. La formación de imágenes de tumores in vivo se describe en "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments", de Burchiel et al., en *Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer*, Burchiel et al., eds., Masson Publishing Inc. (1982) en el Capítulo 13.

Dependiendo de diversas variables, que incluyen el tipo de etiqueta usada y el modo de administración, el intervalo de tiempo que viene tras la administración para permitir que la molécula etiquetada se concentre preferentemente en sitios en el sujeto y que la molécula etiquetada no unida se aclare hasta el nivel basal puede estar aproximadamente entre 6 y 48 horas o aproximadamente entre 6 y 24 horas o aproximadamente entre 6 y 12 horas. En otra

realización, el intervalo de tiempo tras la administración está aproximadamente entre 5 y 20 días o aproximadamente entre 5 y 10 días.

5 En una realización, la monitorización de un trastorno relacionado con el CA 125/0772P, por ejemplo, cáncer, se puede llevar a cabo repitiendo el método de formación de imágenes en varios instantes de tiempo, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, a los seis meses después del diagnóstico inicial, y/o al año después del diagnóstico inicial, y así sucesivamente.

10 Se incluyen métodos de diagnóstico o monitorización de cáncer que comprenden administrar a un sujeto que necesita dicho diagnóstico o monitorización una cantidad del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo etiquetado que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, suficiente para la detección, y detectar el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo etiquetado unido a un órgano o tejido del sujeto. Además, se proporcionan métodos de detección de CA 125/0772P asociado a células, en una muestra biológica, que comprenden hacer entrar en contacto un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo etiquetado que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, y detectar anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo unido a la muestra.

15 En estas realizaciones, la cantidad de molécula etiquetada unida al CA 125/0772P asociado a células se puede comparar a continuación con una cantidad normalizada o con un control, o con la cantidad previamente detectada en el sujeto en un instante de tiempo anterior.

5.10. Métodos de producción de anticuerpos

20 Se pueden producir anticuerpos de la invención mediante cualquier método conocido en la materia para la síntesis de anticuerpos, por ejemplo, mediante tecnología de hibridomas, síntesis química o preferentemente, mediante técnicas de expresión recombinante.

25 Se pueden producir anticuerpos policlonales mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede administrar un CA 125/0772P humano que comprende un polipéptido CA 125/0772P asociado a células, a varios animales hospedadores que incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, conejos, ratones, ratas, y caballos, para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno humano. Se pueden usar varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, y los mismos incluyen, entre otros, el adyuvante de Freund (completo o incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pruronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa (*keyhole limpet hemocyanins*), dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes son también bien conocidos en la materia.

35 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes, y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridomas, que incluyen aquellas conocidas en la materia y dadas a conocer en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual 2^a ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); o Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier (1981) en las páginas 563 a 681).

40 Los métodos para la producción y el cribado en relación con anticuerpos específicos usando una tecnología de hibridomas son rutinarios y bien conocidos en la materia. De manera breve, en un ejemplo, se pueden inmunizar ratones con un polipéptido CA 125/0772P, por ejemplo, un polipéptido CA 125/0772P asociado a células, y una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero de los ratones, el bazo del ratón se recolecta y se aíslan esplenocitos. A continuación, los esplenocitos, mediante técnicas bien conocidas, se fusionan con cualesquiera células de mieloma adecuadas, por ejemplo, células de la línea celular SP2/0-Ag14 disponible en el ATCC (n.º de Acceso CRL-1581). Se seleccionan hibridomas y los mismos se clonan por dilución limitante. A continuación, los clones de los hibridomas se someten a ensayo mediante métodos conocidos en la materia para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un CA 125/0772P asociado a células. Se puede generar líquido ascítico, que en general contiene altos niveles de anticuerpos, inyectando a los ratones clones de hibridomas positivos.

50 Se proporcionan métodos de generación de anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por dichos métodos, que comprenden cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en donde, preferentemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados a partir de un ratón inmunizado con un polipéptido CA 125/0772P, por ejemplo, un polipéptido CA 125/0772P asociado a células, con células de mieloma, y a continuación cribando los hibridomas resultantes de la fusión en busca de clones de hibridomas que secreten un anticuerpo capaz de unirse al polipéptido CA 125/0772P, por ejemplo, un polipéptido CA 125/0772P asociado a células.

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos mediante cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden producir fragmento Fab y F(ab')₂ de la

invencción mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada. Además, los anticuerpos de la presente invencción también se pueden generar usando varios métodos de presentación en fagos, conocidos en la técnica.

En métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales sobre la superficie de partículas fágicas que llevan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. La expresión en fagos, de un dominio de unión a antígeno, que se une a un antígeno polipeptídico CA 125/0772P se puede seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, usando antígeno etiquetado o antígeno unido o capturado a una superficie o microesfera sólida. Entre los ejemplos de métodos de presentación en fagos, que se pueden adaptar de manera que se puedan usar para realizar o identificar los anticuerpos de la presente invencción se incluyen aquellos dados a conocer en Brinkmann et al., J. Immunol. Methods 182(1):41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods. 184(2):177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24(4):952-958 (1994); Persic et al., Gene. 187(1):9-18 (1997); Burton et al., Adv. Immunol. 57 :191-280 (1994) ; las publicaciones PCT n.º WO 91/10737 y WO 95/15982; el documento EP 853.661 ; y las patentes U.S. n.º 5.223.409, 5.403.484, 5.427.908, 5.516.637, 5.571.698, 5.580.727, 5.658.727, 5.667.988, 5.698.426, 5.712.089, 5.733.743, 5.780.225, 5.789.208, 5.821.047, 5.885.793, 5.969.108, 6.096.551, 6.140.470, 6.376.170, 6.265.150, y 6.335.163.

Tal como se ha descrito en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpos provenientes del fago se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o un fragmento deseado de unión a antígeno, y se pueden expresar en un huésped, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levadura, y bacterias, por ejemplo, tal como se describe posteriormente. También se pueden utilizar técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la materia tales como los dados a conocer en las patentes U.S. n.º 5.595.898, 5.698.417, y 6.204.023; Mullinax et al., BioTechniques. 12(6):864-869 (1992), Sawai et al., Am. J. Reprod. Immunol. 34(1):26-34 (1995); y Better et al., Science 240(4855):1041-1043 (1988).

Para generar anticuerpos completos, se pueden usar cebadores de PCR que incluyen secuencias nucleotídicas VH ó VL, un sitio de restricción, y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción, con el fin de amplificar las secuencias VH o VL en clones scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas para aquellos expertos en la materia, los dominios VH amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante VH, y los dominios VL amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante VL, por ejemplo, regiones constantes humanas kappa o lambda. Preferentemente, los vectores para expresar los dominios VH o VL pueden comprender un promotor EF-1 α , una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable, dominios constantes, y un marcador de selección tal como la neomicina. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un vector que exprese las regiones constantes necesarias. A continuación, los vectores de expresión de cadena pesada y los vectores de expresión de cadena ligera se co-transfectan en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia.

Para algunos usos, particularmente el uso *in vivo* de anticuerpos en humanos y ensayos de detección *in vivo*, puede resultar preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados, o completamente humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que se obtiene diferentes partes del anticuerpo a partir de moléculas de inmunoglobulina de diferentes especies. Por ejemplo, y sin ningún sentido limitativo, un anticuerpo quimérico puede tener regiones variables de cadena ligera y/o pesada obtenidas a partir de un anticuerpo murino y regiones constantes de cadena ligera y/o pesada obtenidas a partir de una inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la materia. Véanse, por ejemplo, Morrison, Science. 229(4719):1202-1207 (1985); Oi et al., BioTechniques. 4(3):214-221 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods. 125(1-2):191-202 (1989); y las patentes U.S. n.º 4.816.397, 4.816.567, y 5.807.715.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que comprende una estructura humana, que incluye una región constante humana, y una o más CDRs de un anticuerpo o una especie no humana, por ejemplo, una especie murina. Dichos cuerpos humanizados se pueden generar de manera rutinaria utilizando una variedad de técnicas conocidas en la materia que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT n.º WO 91/09967; y las patentes U.S. n.º 5.225.539, 5.530.101, 5.585.089, 5.766.886, 5.859.205, 6.180.370, y 6.407.213), remodelación de la superficie (*veneering or resurfacing*) (patente U.S. n.º 5.639.641; documento EP 519.596; Remdalan, Mol. Immunol. 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Eng. 7(6):805-814 (1994); y Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(3):969-973 (1994)), y reordenamiento de cadenas (patentes U.S. n.º 5.565.332 y 6.455.253). En una realización preferida, los anticuerpos humanizados comprenden una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDRs enumeradas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 5 ó la Tabla 6 y regiones estructurales humanas. Frecuentemente, los residuos estructurales en las regiones estructurales se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para modificar, preferentemente mejorar, la unión a antígenos. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante un modelo de las interacciones de los residuos de CDR y estructurales para identificar residuos estructurales importantes para la unión a antígenos y una comparación de

secuencias para identificar residuos estructurales no habituales, en posiciones particulares. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.º 5.585.089, 5.770.196, y 5.869.619; y Nature., de Riechmann et al., 332(6162):323-327 (1988).

Los anticuerpos completa o totalmente humanos son deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Se pueden realizar anticuerpos humanos mediante una variedad de métodos conocidos en la materia, que incluyen los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las patentes U.S. n.º 4.444.887, 4.716.111, 5.916.771, 5.939.598, 6.075.181, 6.114.598, 6.150.584, 6.162.963, 6.235.883; la publicación PCT WO 98/46645; y el documento EP 463.151.

También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos génicos de inmunoglobulina humana de cadena pesada y ligera se pueden introducir aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, la región constante, y la región de diversidad se pueden introducir en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón se pueden hacer no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la supresión homocigótica de la región JH evita la producción de anticuerpos endógena. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. A continuación, los ratones quiméricos se crían para producir progenie homocigótica que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan según la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o una parte de un polipéptido CA 125/0772P, tal como un polipéptido CA 125/0772P asociado a células. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de los ratones transgénicos, inmunizados, usando una tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana hospedados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de las células B, y posteriormente experimentan un cambio de clase y una mutación somática. De este modo, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgB terapéuticamente útiles. Para obtener una visión general de esta tecnología con el fin de producir anticuerpos humanos, véase Int. Rev. Immunol., de Lonberg et al., 13(1):65-93 (1995). Para una descripción detallada de esta tecnología con el fin de producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.º 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318, 5.939.598, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.150.584, y 6.162.963. Adicionalmente, se puede contactar con empresas tales como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y Genpharm (San Jose, CA) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica a la que se hace referencia como "selección guiada". En este planteamiento, se usa un anticuerpo monoclonal no humano, seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. Véase, por ejemplo, Bio/Technology, de Jespers et al., 12(4):899-903 (1994).

Además, los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno se pueden utilizar, a su vez, para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" un antígeno usando técnicas bien conocidas para aquellos expertos en la materia, y a partir de los mismos se pueden preparar anticuerpos anti-anti-idiotipo que se unen al antígeno. Véanse, por ejemplo, FASBB. J. de Greenspan et al., 7(5):437-444 (1993); y J. Immunol. de Nisonoff 147(8):2429-2438 (1991).

5.11. Expresión recombinante de anticuerpos y polipéptidos

La expresión recombinante de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células se puede lograr usando un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo dados a conocer en el presente documento. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo, se puede producir el vector para la producción del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n.º 4.816.567, 5.545.405, y 6.331.415.

Se pueden usar métodos que son bien conocidos para aquellos expertos en la materia con el fin de construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos, y señales apropiadas de control transcripcional y traduccional. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Por lo tanto, la exposición proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo dado a conocer en el presente documento, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos dado a conocer, polipéptido de fusión o análogo dados a conocer, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una parte del mismo, o una CDR de cadena pesada

o ligera, enlazado operativamente a un promotor. Dichos vectores también pueden incluir la secuencia nucleotídica que codifica la región constante de la molécula del anticuerpo (véanse, por ejemplo, los documentos EP 216.846, EP 323.997, y la patente U.S. n.º 5.122.464), y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o las cadenas completas tanto pesada como ligera.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales y a continuación, las células transformadas o transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales, bajo condiciones que son propicias para, o que permiten, la producción de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la descripción. Se incluyen células hospedadoras que contienen un vector o polinucleótido que codifica un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo dados a conocer o un fragmento de los mismos, o una cadena pesada o ligera de los mismos, o una parte de los mismos, o un anticuerpo de cadena única dado a conocer, estando enlazada operativamente dicha molécula de polinucleótido a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, en la célula hospedadora se pueden coexpresar vectores que codifican las cadenas tanto pesada como ligera para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, tal como se detalla posteriormente.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de hospedador-vector de expresión para expresar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos dados a conocer (véase, por ejemplo, la patente U.S. n.º 5.807.715). Dichos sistemas de hospedador-expresión representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias codificantes de interés y las mismas posteriormente se pueden purificar, aunque también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, pueden expresar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos de la descripción *in situ*. Los mismos incluyen, aunque sin limitaciones, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN cósmido, ADN plásmido, o ADN bacteriófago recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, o *Pichia maetlanolica*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos; sistemas celulares de insectos transfectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos; sistemas de células vegetales transfectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, o TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CRO, BHK, 293, NSO, ó 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus o el promotor 7.5K del virus vaccinia). Preferentemente, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante completa. Por ejemplo, células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CRO), en combinación con un vector tal como el elemento promotor del gen precoz intermedio principal de citomegalovirus humano son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., *Gene*. 45(1):101-105 (1986) y Cockett et al., *Bio/Technology*. @:662-667 (1990)). En una realización específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos se regulan mediante un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor de tipo celular o específico del tejido.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar de forma ventajosa varios vectores de expresión dependiendo del uso deseado para el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo que se esté expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una cantidad elevada de dicha proteína, por ejemplo, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de niveles altos de productos proteínicos que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., *EMBO J*. 2(10):1791-1794 (1983)), en el cual la secuencia codificante del anticuerpo se puede ligar individualmente en el vector en el mismo marco que la región codificante de lacZ de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye et al., *Nucleic Acids Res*. 13(9):3101-3110 (1985); Van Heeke et al., *J. Biol. Chem*. 264(10):5503-5509 (1989)); y similares. También se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST) (Hakes et al., *Anal. Biochem*. 202(2):293-298 (1992)). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a microesferas de glutatión agarosa en matriz seguida por una elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión por la trombina o la proteasa factor Xa de manera que el producto génico diana clonado se pueda liberar de la fracción de GST.

En un sistema de insectos, se usa el virus de la polihidrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihidrina) del

virus y se puede situar bajo control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). Véase, por ejemplo, Kumar et al., *Biosci. Rep.* 19(3):227-234 (1999).

En células hospedadoras de mamíferos, se pueden utilizar varios sistemas de expresión de base viral. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo se puede ligar a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. A continuación, este gen quimérico se puede insertar en el genoma adenoviral mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 ó E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar los hospedadores infectados por la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, Logan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81(12):3655-3659 (1984)). También se pueden requerir señales de iniciación específicas para una traducción eficaz de secuencias codificantes insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en el mismo marco que el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción del inserto completo. Estas señales de control traduccional y codones de iniciación exógenos pueden tener una variedad de orígenes, tanto natural como sintético. La eficacia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de elementos adecuados potenciadores de la transcripción, terminadores de transcripción, etcétera (véase, por ejemplo, Bitter et al., *Methods Enzymol.* 153:516-544 (1987)).

Adicionalmente, se puede utilizar una estirpe celular hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico según una manera deseada específica. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesado (por ejemplo, escisión) de productos proteínicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos, para el procesado post-traduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para garantizar la modificación y el procesado correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, se pueden usar células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesado adecuado del transcrito primario, la glicosilación, y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamíferos incluyen, aunque sin limitarse a las mismas, células CHO, VERO, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NSO (una línea celular de mieloma murino que no produce de manera endógena ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL 7030 y HsS78Bst.

Para una producción de larga duración y alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable de la proteína. Por ejemplo, se pueden modificar por ingeniería genética líneas celulares que expresan de forma estable la molécula del anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, células hospedadoras se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etcétera), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, se puede dejar que células modificadas por ingeniería genética crezcan durante entre 1 y 2 días en unos medios enriquecidos, y a continuación se cambian a unos medios selectivos. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y que crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este método se puede usar de manera ventajosa para modificar genéticamente líneas celulares que expresen de manera estable la molécula del anticuerpo.

Se pueden usar varios sistemas de selección, que incluyen aunque sin limitarse a los mismos, la timidina quinasa del virus herpes simplex (Wigler et al., *Cell.* 11(1):223-232 (1977)), hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (Spring et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 2118(2):158-162 (1994)), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., *Cell* 22(3):817-823 (1980)) cuyos genes se pueden utilizar respectivamente en células tk-, hgprt- o aprt-. Además, se puede usar la resistencia a antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a metotrixato (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77(6):3567-3570 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(3):1527-1531 (1981)); *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(4):2072-2076 (1981)); *neo*, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu et al., *Biotherapy.* J(1):87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol., Toxicol.* 33:573-596 (1993); Mulligan, *Science.* 260(5110):926-932 (1993); y Morgan et al., *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993)); e *hygro*, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., *Gene* 300-3):147-156 (1984)). Se pueden aplicar de manera rutinaria métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons (1989-2002); Krieglner, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press (1990); Capítulos 12 y 13 de *Current Protocols in Human Genetics*, Dracopoli et al., eds., John Wiley & Sons (1994); y Colbere-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150(1):1-14 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión se pueden incrementar mediante amplificación con vectores (como revisión, véase Bebbington et al., *The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning*, Vol. 3, Academic Press (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el incremento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de célula hospedadora hará que aumente el

número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada al gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3(2):257-266 (1983)).

5 La célula hospedadora se puede co-transfectar con dos vectores de expresión de la descripción, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de
 10 cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, se puede usar un único vector que codifique, y que sea capaz de expresar, polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera se debería situar preferentemente antes que la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature*. 322(6079):562-565 (1986); y Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(4):2197-2199 (1980)). Las
 15 secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico, o una combinación de los mismos.

Una vez que se ha producido un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión de antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la descripción mediante expresión recombinante, el mismo se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante
 15 cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno de CA 125/0772P específico después de la purificación inicial de la Proteína A, y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos dados a conocer en el presente documento se pueden fusionar con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento, o conocidas de otra
 20 manera en la técnica, para facilitar la purificación.

Los siguientes ejemplos se presentan a título ilustrativo.

6. Ejemplos

Los resultados proporcionados en el presente documento demuestran que una porción extracelular de CA 125/0772P permanece en forma asociada a células después de que una porción del polipéptido CA 125/0772P se
 25 haya liberado como CA 125/0772P desprendido. En particular, la presencia de CA 125/0772P asociado a células se demuestra a través de la generación y caracterización exitosas de varios anticuerpos que se unen preferentemente a las especies de CA 125/0772P asociadas a células, con respecto a las especies de CA 125/0772P desprendidas. Además de la unión preferente, los resultados presentados en este documento describen anticuerpos que presentan un alto grado de especificidad para el CA 125/0772P y afinidad para el antígeno de CA 125/0772P asociado a
 30 células. Todavía adicionalmente, los resultados presentados en este documento demuestran que dichos anticuerpos pueden funcionar para mediar la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P.

6.1. Generación de anticuerpos

Los experimentos proporcionados en el presente documento describen la generación de anticuerpos monoclonales contra una porción extracelular de CA 125/0772P. Tal como se demuestra en subsecciones posteriores, los
 35 anticuerpos generados a través de dichas técnicas incluyen aquellos que son específicos para el CA 125/0772P, que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, que presentan un alto grado de afinidad para CA 125/0772P asociado a células, y que pueden funcionar para mediar la lisis de células tumorales positivas para CA 125/0772P.

Construcciones de antígenos y de expresión de antígenos:

40 Se generaron construcciones de expresión para expresar el antígeno CA 125/0772P para su uso en producción de anticuerpos. El primer antígeno, designado 3 repeticiones de 0772P (FIG. 1; ID SEC N.º:1), a expresar incluía las tres repeticiones en tándem más carboxílicas del dominio extracelular de CA 125/0772P, hasta la secuencia transmembrana del CA 125/0772P, aunque sin incluir esta última. El segundo antígeno, designado 3 repeticiones
 45 TM de 0772P (FIG. 2; ID SEC N.º:2), a expresar incluía las tres repeticiones en tándem más carboxílicas del dominio extracelular de CA 125/0772P así como la secuencia transmembrana y citoplásmica representada en la FIG. 2. En particular, secuencias que codificaban cada uno de los antígenos se subclonaron en vectores pSecTag2B (Invitrogen). El vector codifica una secuencia señal de Ig kappa para la secreción y etiquetas myc y 6xhis para la detección y purificación de la proteína expresada.

Expresión de antígenos:

50 Se produjo antígeno recombinante transfectando transitoriamente células CHO-K1 en suspensión con las construcciones antes descritas. Los medios usados para la transfección fueron ProCHO CDM (BioWhittaker Inc. Walkersville, MD) con complementos de GS (JRH Biosciences Lenexa, KS). Para producir un litro de material, se rehidrataron 2 mg del reactivo de transfección Clonfection™ (Clontech, Palo Alto, Ca), los mismos se diluyeron en 24 ml de medios de transfección y se incubaron 15 minutos con 125 µg de ADN en los mismos medios. La mezcla de
 55 transfección se adicionó a 450 ml de medios de transfección que contenían $1,25 \times 10^9$ células CHO-K1 en suspensión y se incubaron 4 horas a 37 °C en un agitador orbital. Tras la incubación, a las células transfectadas se adicionaron 500 ml de ProCHO 4-CDM con complementos de GS, penicilina-estreptomomicina y FBS con nivel

ultrabajo de IgG al 10 % (Life Technologies Rockville, MD), y el cultivo se transfirió a botellas rotatorias. Al 3 día se recogieron muestras y los cultivos se recolectaron al 7 día.

Purificación de antígenos:

Se concentró sobrenadante de transfección en 250 ml usando un sistema Millipore Pellicon con una membrana con un valor de corte de 50 K. 2 ml de resina Talon (Clontech, Palo Alto, CA), obtenida a partir del kit de Purificación TALON (cat n.º K1253-1), se transfirieron a una columna de 2 ml y se lavaron con 20 ml de 1X tampón de lavado/extracción (suministrado con el kit, pH 7.0). A continuación la muestra concentrada se cargó en la columna con un caudal de 1 ml/minuto. La columna se lavó entonces con 15 ml de tampón de extracción/lavado. A continuación, la proteína unida se eluyó con 4x1 ml de tampón de elución (fosfato de Na 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 150 mM, pH 7.0). Se recogió medio ml de fracciones y el mismo se analizó mediante SDS-PAGE se visualizó usando Azul Brillante de Coomassie G-250. Fracciones que contenían proteína recombinante de 3 repeticiones de 0772P se purificaron adicionalmente por cromatografía con Con-A Sepharose. Un ml de Con A Sepharose (Vector Laboratories, Inc., cat n.º AC-1003, lot n.º K0425) se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml y se lavó con 10 ml de 1X solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.2. El tampón de lavado se eliminó por centrifugación. Fracciones de la purificación TALON que contenían proteína de 3 repeticiones de 0772P se diluyeron 1:1 con 1X PBS, pH 7.2 y se adicionaron a ConA Sepharose lavada y se sometieron a rotación durante la noche a 4 °C. A continuación, la suspensión de resina se transfirió a una columna de flujo de gravedad de 5 ml y se lavó con 10 ml de 1X PBS, pH 7.2. Se eluyeron muestras con metil α -D-mannopiranosido 0,6 M en 1X PBS, pH 7.2 en 0,5 ml de fracciones en un volumen total de 6 ml. Se analizaron fracciones por SDS-PAGE y las mismas se visualizaron usando Azul Brillante de Coomassie G-250. Fracciones que contenían proteína de 3 repeticiones de 0772P pura se combinaron y se dializaron contra 2 L de 1X PBS, pH 7.2 y se almacenaron a 4 °C.

Inmunización:

Ratones BALB/c se inmunizaron intraperitonealmente (i.p.) en los Días 0, 21, 42, y 63. La primera inyección fue con células NIH:OVCAR-3 (ATCC HTB-161) y las inyecciones posteriores fueron con proteína de 3 repeticiones de 0772P sin un dominio transmembrana. Para la primera inyección de proteína se usó el adyuvante completo de Freund y para las inyecciones restantes se usó el adyuvante incompleto de Freund. Se recogió suero en los días 35, 56, y 77 y el mismo se analizó por ELISA y citometría de flujo tal como se describe posteriormente. Para la fusión celular se seleccionaron ratones con los mejores títulos séricos. El primer día y dos antes de la fusión, los ratones seleccionados se reforzaron con proteína de 3 repeticiones de 0772P expresada en mamífero i.p. e intravenosamente (i.v.). El día antes de la fusión los ratones se reforzaron i.v.

Producción de hibridomas:

Se extrajo el bazo de los ratones y se recolectaron células del bazo troceando con pinzas y cribando las células a través de un tamiz. Las células se lavaron dos veces en medio IMDM y se realizaron recuentos celulares. Se recolectaron células de mieloma de ratón P3X63Ag8.653 (ATCC CRL-1580) en crecimiento de fase logarítmica, las mismas se lavaron dos veces en medio IMDM y se realizó un recuento de las células. Células del bazo y células de mieloma se mezclaron juntas en una relación de 5:1 y se centrifugaron a 200 x g durante 5 minutos. Después de la aspiración, el pellet se soltó dando golpes en el fondo del tubo. Se adicionó gota a gota durante un periodo de 30 segundos un ml de una solución al 50 % de PEG (peso molecular 1.450) y a continuación el pellet se mezcló suavemente durante 30 segundos usando una pipeta. La suspensión resultante se dejó en reposo sin perturbaciones durante otros 30 segundos. Se adicionaron 5 ml de IMDM durante un periodo de 90 segundos seguidos inmediatamente por otros 5 ml. La suspensión celular resultante se dejó sin perturbaciones durante 5 minutos. Tras la centrifugación, las células se resuspendieron en medio HAT (IMDM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 0,6 % (solución al 0,04 %), hipoxantina, aminopterina, timidina, y Factor de Clonación para Hibridomas ORIGENÓ al 10 % (IGEN International, Gaithersburg, MD)) a una concentración de 5×10^5 células por ml y se sembraron en placas de 96 pocillos a 0,2 ml ó 1×10^5 células por pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 7 % con humedad del 100 %. Siete días después de la fusión, los medios se extrajeron y se sustituyeron por IMDM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, solución madre de 2-mercaptoetanol al 0,6 % (0,04 %), hipoxantina y timidina. Entre diez y catorce días después de la fusión, el sobrenadante se sacó de los pocillos con colonias de hibridomas en crecimiento y se sometió a prueba en relación con la unión a CA 12510772P tal como se describe en el presente documento.

Purificación de anticuerpos de sobrenadantes de hibridomas:

Una columna desechable de 5 ml (Bio-Rad, Hercules, CA) se llenó con medio ml de resina de proteína G (Sigma, St. Louis, MO). La columna se pre-equilibró con 20 ml de tampón de unión (PBS 20 mM, pH 7.0). El sobrenadante se hibridoma se cargó en la columna a un caudal menor que 0,5 ml/minuto. A continuación, la columna se lavó con 20 ml de tampón de unión a un caudal de 1 ml/minuto. Alternativamente, se usaron columnas de Proteína G pre-llenadas (Amersham Pharmacia Biotech). A continuación, el anticuerpo se eluyó con 3 ml de tampón de elución (glicina 0,1 M, pH 2,7). Se recogieron fracciones de 0,5 ml en tubos de 1 ml que contenían 50 μ l de Tris 1 M, pH 9.0. Se dializaron muestras contra PBS (0,5 L) y las mismas se concentraron a aproximadamente 1 mg/ml de proteína.

Concentraciones de anticuerpos en sobrenadantes de hibridomas:

Se determinaron concentraciones de anticuerpo usando el kit de ensayo Easy-Titer Mouse IgG Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Resumiendo, un patrón molecular completo de IgG de Ratón (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) se diluyó a 500 ng/ml en tampón de dilución (suministrado con el kit). Este patrón se diluyó 1:2 de forma seriada seis veces en tampón de dilución para generar una curva patrón. Veinte µl de cada patrón se adicionaron a pocillos correspondientes en una placa de 96 pocillos. A la placa también se le adicionaron diluciones de sobrenadante de hibridoma (20 µl). Se obtuvieron pocillos duplicados para cada patrón y muestra. A cada pocillo se le adicionaron veinte µl de microesferas de poliestireno (suministradas con el kit), las muestras se mezclaron, la placa se selló, y se incubó en un agitador de placas durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, cada pocillo se le adicionaron 100 µl de reactivo de Bloqueo del kit. La placa se agitó nuevamente durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas Vmax (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) y se usó un ajuste de 4 parámetros para generar la curva patrón.

6.2. Especificidad para el CA 125/0772P

Los resultados presentados en este documento demuestran que la producción de anticuerpos a través de las técnicas antes descritas dieron como resultado la generación de anticuerpos específicos para el CA 125/0772P.

Ensayo de especificidad ELISA

Métodos:

Se incubaron placas de noventa y seis pocillos y las mismas se recubrieron con 100 µl (por pocillo) de 1 µg/ml de proteína de 3 repeticiones de 0772P (ID SEC N.º:1) (purificada por afinidad) en tampón de bicarbonato (0,2 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,6, Sigma) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con 200 µl de 1x PBST (1x solución salina tamponada con fosfato (PBS), Tween 20 0,05 %) tres veces y se bloquearon con 100 µl de 1 x PBST que contenía seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar las placas con 1 x PBST tres veces, a las mismas (pocillos individuales) se les adicionaron anticuerpos producidos por hibridomas seleccionados anti-CA 125/0772P murinos (0,04 mg/µl). Después de 1 hora de incubación a 37 °C, a continuación las placas se lavaron con 1 x PBST tres veces. Para la detección de señales, a cada pocillo se le adicionaron 100 µl de IgG anti-ratón de oveja, conjugada con HRP (peroxidasa de rábano) (dilución 1:2000 en 1 x PBST + BSA al 1 %; Amersham Biosciences), y los mismos se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente tres veces con 1 x PBST. Finalmente, en cada pocillo se adicionaron 100 µl de una mezcla de sustrato de TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina) y H₂O₂ (relación 1:1, KPL Kirkguard Perry Laboratories), y, después de una incubación de 5 minutos, se midió la absorbancia a 405 nm con un lector de placas (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). El ensayo se realizó por triplicado para cada anticuerpo producido por hibridoma 0772P seleccionado y se recogieron y analizaron datos en forma de un ensayo cinético, medido durante un periodo de tiempo de 5 minutos. Se calcularon y presentaron valores promedio. En cada experimento se incluyeron también controles para reactivos blancos e individuales.

Resultados:

La siguiente tabla 7 presenta los resultados del Ensayo de Especificidad ELISA para cuatro anticuerpos producidos por hibridoma anti-CA 125/0772P seleccionados (117.1, 368.1, 501.1, 776.1). La tabla muestra también los resultados del Ensayo de Especificidad ELISA para dos anticuerpos CA 125/0772P disponibles comercialmente (OC125 y M11, Dako Corp., Carpinteria, CA). Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo en este ensayo (es decir, es específico para el CA 125/0772P) si presenta una absorbancia de entre por lo menos 5 y más de 30 OD/microgramo de anticuerpo. Estos resultados muestran que cada uno de los anticuerpos sometidos a prueba es específico para el CA 125/0772P. Se observa, tal como se demuestra posteriormente, que, aunque el OC125 y el M11 se consideran específicos para el CA 125/0772P, ninguno de los anticuerpos se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido. SD = desviación típica.

TABLA 7

Nombre de Ac	absorbancia (OD)	SD	absorbancia (OD)/µgAc
OC 125	0,73	0,003	18
M11	0,974	0,008	24
117.1	0,619	0,033	15
368.1	1,293	0,004	32
501.1	0,856	0,005	21
776.1	1,178	0,043	29

Los resultados de la Tabla 8 a continuación muestran datos de absorbancia para veinte anticuerpos adicionales generados usando las técnicas antes descritas. Tal como se muestra mediante los datos de absorbancia, cada uno de estos anticuerpos es también específico para el CA 125/0772P.

TABLA 8

Nombre de Ac	absorbancia (OD)/ μgAc
325.1	24
446.1	27
621.1	27
633.1	18
654.1	22
725.1	25
8G9	22
7F10	19
8A1	18
8C3	23
15C9	28
8E3	18
8B5	18
7G10	20
16C7	22
7C6	23
7H1	26
16H9	22
7A11	22
4E7	19

5

Ensayo de especificidad por citometría de flujo:

Método:

Se extrajeron células (OVCAR-3 (n.º de Accesoión ATCC HTB-161), SK-OV3 (n.º de Accesoión ATCC HTB-77), NIH/3T3 (n.º de Accesoión ATCC CRL-1658), y células NIH/3T3 transfectadas con una secuencia que expresa la proteína de 3 repeticiones de 0772P (ID SEC N.º:2)) de placas de cultivo por digestión con tripsina (0,25 %). Las células se contaron y se valoró la viabilidad mediante exclusión con azul tripán (0,2 %). A continuación las células se centrifugaron (500xg, 5 minutos) y se resuspendieron en tampón de FACS (1x DPBS que contenía BSA al 1 % y azida sódica al 0,1 %). A una concentración entre 5 y 10×10^7 células/ml. A continuación las células se distribuyeron a un volumen de 100 μl /pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se centrifugaron a 500xg durante 3 minutos. El sobrenadante de anticuerpos se extrajo por aspiración, y sobrenadantes de hibridomas de 50 μl se diluyeron a 1 $\mu\text{g/ml}$ y 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en tampón de FACS y se adicionaron a cada pocillo que contenía células. Como control negativo se incluyó IgG1 kappa murina (Sigma, St. Louis, MO) (en una de las siguientes opciones: 2,0, 1,0, 0,5, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y como controles positivos se incluyeron OC125 y M11 (DAKO Corp., Carpintería, CA). Las placas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con balanceo. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con tampón de FACS (200 μl /pocillo), siguiendo a cada lavado una centrifugación y una aspiración del tampón. Biotina-IgG de cabra anti-ratón (Fc) (Sigma, St. Louis, MO) se diluyó 1:1.000 en tampón de FACS y, se adicionaron 50 μl a cada pocillo que contenía células. Se incubaron placas 30 minutos a 4 °C con balanceo. A continuación, las células se lavaron con tampón de FACS tal como anteriormente. Estreptavidina-Alexa-Four 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) se diluyó 1:1.000 en tampón de FACS y se adicionaron 50 μl a cada pocillo que contenía células. A continuación, las placas se incubaron 30 minutos a 4 °C con lavado. Las células se lavaron entonces con tampón de FACS, tal como anteriormente. A continuación, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de FACS y se transfirieron a tubos Falcon 2052 y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur de Becton-Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, CA).

Resultados:

La Tabla 9 a continuación presenta los resultados del Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo de cuatro anticuerpos producidos por hibridomas anti-CA 125/0772P seleccionados (117.1, 368.1, 501.1, 776.1). La tabla muestra también los ensayos del Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo para el OC125 y el M11 disponibles comercialmente. Las células NIH/3T3 y las células SK-OV3 (una línea celular de cáncer de ovario) se consideraron controles negativos ya que ninguna produce CA 125/0772P.

Los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos) se consideran positivos (es decir, son específicos para el CA 125/0772P) si presentan un resultado de Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo dentro de los siguientes intervalos celulares positivos: menos que aproximadamente un 5 % de células NIH/3T3 positivas, y por lo menos aproximadamente un 60 % de células NIH/3T3 positivas que producen un polipéptido ID SEC N.º:2; o menos que aproximadamente un 25 % de células SK-OV3 positivas y por lo menos aproximadamente un 80 % de células de OVCAR-3 positivas. (nd – no determinado)

Estos resultados demuestran que cada uno de los anticuerpos sometidos a prueba es específico para el CA 125/0772P. Se observa, tal como se demuestra posteriormente, que, aunque el OC125 y el M11 se consideran específicos para el CA 125/0772P, ninguno de estos dos anticuerpos se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido.

TABLA 9

Anticuerpo	% positivo-NIH/3T3 3 repeticiones de 0772P	% positivo-NIH/3T3	% positivo-OVCAR-3	% positivo-SK-OV3
OC 125 (1_µg/ml)	nd	nd	98	16
OC 125 (0,1 µg/ml)	nd	nd	85	10
M11 (1µg/ml)	84	0,1	98	17
M11 (0,1 µg/ml)	nd	nd	91	11
117,1 (2µg/ml)	83	0,1	93	6
117,1 (0,5 µg/ml)	63	0	nd	nd
386,1 (0,1 µg/ml)	86	0,2	89	5
386,1 (2 µg/ml)	75	0,2	nd	nd
501,1 (0,5 µg/ml)	89	0	95	5
501,1 (2 µg/ml)	85	0,2	nd	nd
776,1 (0,5 µg/ml)	86	0	94	9
776,1 (0,1 µg/ml)	84	0	nd	nd

Los resultados proporcionados en la siguiente Tabla 10 presentan datos de OVCAR-3/SK-OV3 para veinte anticuerpos adicionales generados tal como se ha descrito anteriormente, que demuestran que estos anticuerpos son también específicos para el CA 125/0772P.

TABLA 10

Nombre de Ac	% positivo OVCAR-3 (0,5 µg/ml)	% positivo SK-OV3 (2,0 mg.ml)
325.1	98	6
446.1	94	5
621.1	97	9
633.1	89	9
654.1	86	8
725.1	96	10
8G9	97	4
7F10	96	3
8A1	97	3
8C3	97	3

15C9	95	3
8E3	95	1
8B5	94	1
7G10	96	2
16C7	96	3
7C6	96	3
7H1	96	0
16H9	96	3
7A11	94	1
4E7	97	2

6.3. Los ensayos de competición demuestran la producción exitosa de anticuerpos que se unen preferentemente a CA 125/0772P

5 Los resultados presentados en este documento demuestran que anticuerpos producidos a través de las técnicas antes descritas pueden generar anticuerpos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, con respecto a CA 125/0772P desprendido. El hecho de que dichos anticuerpos se puedan generar demuestra también, por primera vez, que existen polipéptidos CA 125/0772P asociados a células, es decir, que una porción extracelular de CA 125/0772P permanece en una forma asociada a células, aunque sea de forma transitoria, después de que se haya liberado una porción del polipéptido CA 125/0772P como CA 125/0772P desprendido.

10 Ensayo de competición ELISA:

Método:

15 Placas de noventa y seis pocillos se recubrieron con 100 µl (por pocillo) de 1 µg/ml de polipéptido de 3 repeticiones de 0772P (ID SEC N.º:1) (purificado por afinidad) en tampón de bicarbonato (0,2 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.6, Sigma) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con 200 µl 1 X PBST (1 X solución salina tamponada con fosfato (PBS), Tween 20 al 0,05 %) tres veces y se bloquearon con 100 µl de 1 x PBST que contenía seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % durante 2 horas a 37 °C. Después de un lavado con 1 X PBST tres veces, anticuerpos producidos por hibridomas anti-CA 125/0772 seleccionados con concentraciones indicadas (por ejemplo, 0,04 µg/ml) se adicionaron a pocillos que se habían preincubado durante entre 20 y 30 minutos con cantidades en exceso (por ejemplo, entre 10 y 50 veces peso/peso) de CA 125/0772P desprendido (Fitzgerald Industries International, Concord, MA; Scripps Laboratories, La Jolla, CA; y/o United States Biological Corp.). Después de 1 hora de incubación a 37 °C, a continuación las placas se lavaron con 1 X PBST tres veces. Para la detección de señales, a cada pocillo se le adicionaron 100 µl de IgG de oveja anti-ratón conjugada con HRP (dilución 1:2.000 en 1 X PBST + 1 % BSA, Amersham Biosciences) y los mismos se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente con 1 X PBST tres veces. Finalmente, en cada pocillo se adicionaron 100 µl de una mezcla de sustrato de TMB y H₂O₂ (relación 1:1, KPL), y se midió la absorbancia a 405 nm con un lector de placas (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA). El ensayo se realizó por triplicado para cada anticuerpo seleccionado, y se calcularon y presentaron valores promedio. Se calculó el porcentaje de inhibición en comparación con la no existencia de competición, para anticuerpos individuales basándose en valores promedio. En cada experimento se incluyeron también controles para reactivos blancos e individuales.

30 Resultados:

35 La siguiente Tabla 11 presenta los resultados del Ensayo de Competición ELISA para cuatro anticuerpos producidos por hibridomas anti-CA 125/0772P seleccionados (117.1, 368.1, 501.1, 776.1). La tabla muestra también los resultados del Ensayo de Competición ELISA para el anticuerpo CA 125/0772P disponible comercialmente (OC125; DAKO Corp., Carpintería, CA). Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo en este ensayo (es decir, se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células) si presenta menos que aproximadamente el 25 % de inhibición de unión con un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/0772P. Estos resultados demuestran que cada uno de los anticuerpos 117.1, 368.1, 501.1 y 776.1 se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células. Estos resultados demuestran también que el anticuerpo OC125 no consigue unirse preferentemente a CA 125/0772P asociado a células. (SD-desviación típica)

40

TABLA 11

anticuerpo	absorbancia	SD	absorbancia con competidor CA 125/0772P desprendido (exceso de 25 veces peso/peso)	SD	porcentaje de inhibición de unión	absorbancia con competidor de 3 repeticiones de 0772P (exceso de 10x peso/peso)	SD	porcentaje de inhibición de unión
OC 125	0,73	0,003	0,074	0,001	95	0,047	0,002	99
117.7	0,619	0,033	0,554	0,007	11	0,071	0,001	94
368.1	1,293	0,004	1,333	0,009	0	0,915	0,016	30
501.1	0,856	0,005	0,735	0,008	15	0,065	0,002	96
776.1	1,178	0,043	0,977	0,01	17	0,077	0,001	96

Los resultados presentados en la Tabla 12 a continuación presentan datos de competidor de CA 125/0772P para veinte cuerpos adicionales generados a través de las técnicas antes descritas, que demuestran que estos cuerpos también representan anticuerpos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células.

5

TABLA 12

Nombre de Ac	% inh. unión con competidor de CA 125/0772P desprendido (exceso 25 veces)
325.1	2
446.1	7
621.1	2
633.1	7
654.1	9
725.1	7
8G9	7
7F10	6
8A1	8
8C3	5
15C9	5
8E3	4
8B5	6
7G10	3
16C7	3
7C6	2
7H1	4
16H9	0
7A11	5
4E7	7

Ensayo de competición por citometría de flujo:

Método:

- 10 Se extrajeron NIH:OVCA-3 (n.º de Acceso ATCC HTB-161) de placas de cultivo por digestión con tripsina (0,25 %). A continuación se contaron las células y se valoró la viabilidad mediante exclusión con azul tripán (0,2 %). A continuación las células se centrifugaron (500xg, 5 minutos) y se resuspendieron en tampón de FACS (1XDPBS que

5 contenía BSA 1 % y azida sódica 0,1 %) a una concentración entre 5 y 10 x10⁷ células/ml. A continuación las células se distribuyeron (100 µl/pocillo) en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se centrifugaron 500xg durante 3 minutos. Los sobrenadantes se extrajeron por aspiración. Sobrenadantes de hibridomas se diluyeron a 0,2 µg/ml de anticuerpo en tampón de FACS. CA 125 (Fizgerald Industries International, Concord, MA) se diluyó a 1.000 µg/ml, 500µg/ml, 200 µg/ml, 60 µg/ml, 20 µg/ml, 6 µg/ml ó 2µg/ml en tampón de FACS. Treinta µl de solución de anticuerpo se incubaron con 30 µl de CA 125 diluido o tampón solo durante 30 minutos a 4 °C. A cada pocillo que contenía células se le adicionaron 50 µl de la mezcla. IgG1 kappa murina (Sigma, St. Louis, MO) y M11 (DAKO Corp., Carpinteria, CA) se incluyeron respectivamente como controles negativo y positivo. Las placas se incubaron durante 10 30 minutos a 4 °C con balanceo. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con tampón de FACS (200 µl/pocillo), siguiendo a cada lavado una centrifugación y aspiración de tampón. Biotina-IgG de cabra anti-ratón (Fc) (Sigma, St. Louis, MO) se diluyó 1:1.000 en tampón de FACS y a cada pocillo que contenía células se le adicionaron 50 µl. Las placas se incubaron 30 minutos a 4 °C con balanceo. A continuación las células se lavaron con tampón de FACS tal como anteriormente. Estreptavidina-Alexa-Flúor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) se diluyó 1:1.000 en 15 tampón de FACS y a cada pocillo que contenía células se le adicionaron 50 µl. A continuación las placas se incubaron 30 minutos a 4 °C con un lavado. Las células se lavaron entonces con tampón de FACS, tal como anteriormente. A continuación, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de FACS y se transfirieron a tubos Falcon 2052 y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur de Becton-Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, CA). Se representó el porcentaje de células positivas en función de la concentración de CA 125/0772P usando un software de representación GraphPad. Usando un análisis de regresión lineal se realizaron 20 determinaciones de IC₅₀, expresada como la concentración de CA 125/0772P desprendido a la que se observa el 50 % de inhibición de la unión.

Resultados:

25 La FIG. 3 muestra una representación representativa de la concentración de CA 125/0772P desprendido con respecto al porcentaje de células positivas para, en este caso, anticuerpo 117.1 y control de anticuerpo M11 (cuadrados).

La Tabla 13 a continuación presenta un resumen de resultados del Ensayo de Competición por Citometría de Flujo. Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo (es decir, se considera que se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células) si presenta una IC₅₀, según se mide mediante porcentaje de células positivas, de por lo menos aproximadamente 0,05 mg/ml de CA 125/0772P desprendido.

30 Los resultados mostrados en la Tabla 13 a continuación demuestran que cada uno de los anticuerpos 117.1, 501.1, 776.1, 8C3, 16H9, 325.1, 633.1 y 725.1 se une preferentemente a CA 125/0772P asociado a células. Se observa que los resultados de la Tabla 13 demuestran también que los anticuerpos OC125 y M11 no se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células.

TABLA 13

anticuerpo	IC ₅₀ (mg/ml CA 125) función del % células positivas
OC 125	0,005
M11	0,01
117.1	>1,0
368.1	nd
501.1	0,13
776.1	0,19
8C3	>0,5
16H9	>0,5
325.1	0,36
621.1	>0,5
633.1	0,18
725.1	0,42
446.1	nd
654.1	nd
8G9	nd
7F10	nd
8A1	nd
15C9	nd

8E3	nd
8B5	nd
7G10	nd
16C7	nd
7C6	nd
7H1	nd
7A11	nd

6.4. Afinidad

5 Los resultados presentados en este documento demuestran que entre los anticuerpos generados que se unen preferentemente a CA 125/0772P, se encuentran anticuerpos que presentan un alto grado de afinidad para CA 125/0772P asociado a células.

Ensayo de afinidad BIAcore: métodos:

10 Un chip biosensor BIAcore GM5 se acopló al instrumento BIAcore X y se activó con 55 µl de NHS/EDC 1:1 a temperatura ambiente. Proteína de la región de 3 repeticiones de 0772P y BSA a 10 µg/ml en tampón acetato 0,05 M, pH 4.5, se inmovilizaron en la célula de flujo (FC) 1 y FC2 del chip activado, respectivamente, con un caudal de 5 µl/minuto para lograr una respuesta de resonancia de entre 1.000 y 2.000 RU. A continuación, el chip se bloqueó por
15 inyección de 55 µl de etanolamina-HCl, pH 8.5, y la siguió un lavado 5 veces con NaOH 50 mM- NaCl 1 M. Para medir la unión de anticuerpos monoclonales anti-0772P a la región de 3 repeticiones de 0772P inmovilizada en el chip, sobre la superficie del sensor, a un caudal de 5 µl/minuto, se inyectaron 30 µl de anticuerpos monoclonales anti-0772P con concentraciones variables en tampón de desplazamiento (*running buffer*) BIAcore (HBS-EP, Cat. n.º1001-080, BIAcore, Piscataway, NJ). Tras finalizar la fase de inyección, se monitorizó la disociación en tampón de desplazamiento BIAcore con el mismo caudal durante 360 segundos. La superficie se regeneró entre inyecciones usando 30 µl de NaOH 50 mM- NaCl 1 M. Se analizaron sensogramas individuales usando BIAevaluation.

Ensayo de afinidad BIAcore: resultados:

20 La Tabla 14 a continuación presenta un resumen de resultados del Ensayo de Afinidad BIAcore para anticuerpos 117.1, 368.1, 501.1 y 776.1, así como para anticuerpos M11 y OC125. Tal como se muestra en la tabla, cada uno de los anticuerpos 117.1, 368.1, 501.1, 776.1, 4E7, 7C6, 7F10, 7G10, 7H1, 8A1, 8B5, 8C3, 8E3, 15C9, 16C7, 16H9, 325.1, 621.1, 633.1 y 725.1 se une con una alta afinidad al polipéptido CA 125/0772P.

TABLA 14

Anticuerpo	K _d (nM)
M11	1,6
OC125	4
117.1	12
368.1	0,7
501.1	70
776.1	0,4
4E7	30
7A11	Nd
7C6	73
7F10	3,7
7G10	47
7H1	69
8A1	2,8
8B5	32
8C3	5,0
8E3	33
8G9	14

15C9	14
16C7	44
16H9	3,9
325.1	15
446.1	Nd
621.1	40
633.1	26
654.1	190
725.1	2,6

6.5. Ensayos funcionales:

Los resultados presentados en este documento demuestran que entre los anticuerpos generados que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células se encuentran anticuerpos que pueden funcionar para mediar la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/0772P.

Ensayo de ADCC:

Método:

Se aislaron leucocitos humanos de sangre periférica de donantes normales mediante un procedimiento de centrifugación en gradiente Histopaque-1077 (Sigma Co., St. Louis, MO) y los mismos se usaron como células efectoras. En placas de 96 pocillos, de fondo en U, células diana OVCAR-3 (5×10^3 /pocillo) se mezclaron con leucocitos humanos purificados por Histopaque con unas relaciones de efector-a-diana (E/T) de entre 12,5:1 y 50:1 en ausencia o presencia de concentraciones variables de anticuerpos monoclonales en un volumen total de 120 μ l de RPMI 1640 complementado con FBS 10 %. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada. Como controles negativos se usaron células diana y células efectoras sin el anticuerpo de prueba. Después de entre 16 y 18 horas de incubación, se recogieron alícuotas de 50 μ l de sobrenadante del cultivo y las mismas se sometieron a ensayo en relación con la actividad lactato deshidrogenasa en placas de 96 pocillos, de fondo plano, usando el Kit de Ensayo de Citotoxicidad No Radiactivo Cytotox 96 (Promega Co., Madison, WI) según instrucciones de fabricante. El porcentaje de lisis de células tumorales se calculó de la manera siguiente: % Citotoxicidad = (liberación experimental – liberación espontánea efector – liberación espontánea diana)/(liberación máxima diana – liberación espontánea diana) x 100. Los resultados se expresaron como porcentaje medio de lisis \pm S.D. de muestras duplicadas.

Resultados:

La FIG. 4 muestra una gráfica representativa del porcentaje de lisis con respecto a la concentración de anticuerpo para el anticuerpo 117.1 (promedio de 4 donantes independientes). Tal como se muestra en la figura, el anticuerpo 117.1 media la lisis de células de cáncer de ovario OVCAR-3 de una manera dependiente de la dosis.

Ensayo de CDC:

En placas de 96 pocillos, de fondo en U, células diana OVCAR-3 (2×10^4 /pocillo) se mezclan con complemento humano o de cobaya diluido 15:1, 20:1, 25:1 en ausencia o presencia de concentraciones variables de anticuerpo en un volumen total de 120 μ l de RPMI 1640 complementado con FBS 10 %. Las placas se incuban a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada. Como controles negativos se usan células diana sin anticuerpo. Después de 4 horas de incubación, se recogen alícuotas de 50 μ l de sobrenadante de cultivo y las mismas se someten a ensayo en relación con la actividad lactato deshidrogenasa en placas de 96 pocillos, de fondo plano, usando el Kit de Ensayo de Citotoxicidad No radioactivo Cytotox 96 (Promega Co., Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de lisis de células tumorales se calcula de la manera siguiente: % Citotoxicidad = (liberación experimental – liberación espontánea efector – liberación espontánea diana)/(liberación máxima diana – liberación espontánea diana) x 100. Los resultados se expresan como porcentaje medio de lisis \pm S.D. de muestras duplicadas.

6.6. Secuencias de anticuerpos que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células

Los resultados presentados en este documento proporcionan las secuencias de aminoácidos y nucleotídicas para las regiones variables de seis de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento: 117.1, 368.1, 501.1, 776.1, 725.1 y 16H9, incluyendo secuencias de CDR.

Métodos:

Células de hibridoma se recolectaron y peletizaron a 1.800 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se adicionó un ml de TRIzol (Invitrogen) por 10⁷ células y se procesó el ARN total. Se adicionaron doscientos µl de cloroformo por 1 ml de Reactivo de TRIzol, los mismos se agitaron vigorosamente a mano durante 15 segundos y se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa que contenía el ARN se transfirió a un tubo limpio y se precipitó adicionando 500 µl de alcohol isopropílico por 1 ml de Reactivo de TRIzol usado para la homogeneización inicial. El pellet de ARN se lavó una vez con EtOH 70 % y se secó al aire brevemente antes de ser resuspendido en agua-DEPC. Tres µs de ARN total se trataron con 10 unidades de fosfatasa intestinal de ternera (CIP) durante 1 hora a 50 °C para eliminar los fosfatos en 5'. Esta etapa eliminó ARNm truncado y ARN no mensajero de las etapas posteriores. El ARN desfosforilado se trató con 0,5 unidades de pirofosfatasa ácida del tabaco (TAP) durante 1 hora a 37 °C para eliminar la estructura de caperuza 5' de ARNm de longitud completa intacto. El Oligo ARN de GeneRacer (5'-CGACUGGACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3'; ID SEC N.º:43) se ligó al extremo 5' del ARNm usando 5 unidades de ARN Ligasa de T4 durante 1 hora a 37 °C. El ARNm ligado se sometió a transcripción inversa usando 5 unidades de Transcriptasa Inversa de AMV y el Cebador Oligo dT de GeneRacer (5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGT(T)₁₈-3', ID SEC N.º:44) durante 1 hora a 42 °C para crear ADNc con sitios de cebado conocidos en los extremos 5' y 3'. Los extremos 5' se amplificaron usando un cebador 3' específico del gen, situado en la región constante del gen deseado (cadena pesada 5'-AYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC (ID SEC N.º:45), la cadena ligera 5'-GGATACAGTTGGTGCAGCATC-3' (ID SEC N.º:46)) y el Cebador 5' de GeneRacer homólogo al Oligo ARN de GeneRacer (5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'; ID SEC N.º:47). La reacción de PCR se llevó a cabo usando 2 µl de ADNc desnaturalizando el molde a 94 °C durante 5 minutos y, a continuación, desnaturalizando a 94 °C durante 30 segundos, alineando a 55 °C durante 30 segundos, aplicando elongación a 72 °C durante 1 minuto durante 30 ciclos y aplicando elongación durante un ciclo final a 72 °C durante 7 minutos en un Sistema de PCR GeneAmp 9700. Las bandas de interés se purificaron con gel usando el Kit de Purificación con Gel Qiagen y se clonaron usando el Kit de Clonación TOPO-4 (Invitrogen). Las colonias aisladas resultantes se cribaron por PCR para el inserto de tamaño correcto en una máquina GeneAmp 9700. La PCR se realizó lisando las bacterias a 94 °C durante 8 minutos, a continuación desnaturalizando a 94 °C durante 30 segundos, alineando a 55 °C durante 30 segundos, aplicando elongación a 72 °C durante entre 1 y 4 minutos durante 25 ciclos y aplicando elongación durante un ciclo final a 72 °C durante 7 minutos. Los cebadores usados para el cribado fueron: sentido, 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3' (ID SEC N.º:48) ó 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (ID SEC N.º:49), cebadores de región constante de cadena pesada o ligera antisentido (véase más arriba). Se dejaron crecer clones positivos en un cultivo durante la noche, de 4 ml, para amplificar el clon y se realizó una Miniprep SNAP (Invitrogen). A continuación los clones se secuenciaron usando las aplicaciones químicas BigDye (Perkin Elmer) en un Sistema de PCR GeneAmp 9700 durante 25 ciclos desnaturalizando el ADN durante 10 segundos a 94 °C, alineando el cebador (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3' (ID SEC N.º:50) ó 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (ID SEC N.º:51)) a 50 °C durante 5 segundos, y aplicando elongación del cebador durante 4 minutos a 72 °C. Las reacciones a continuación se pasaron a una Columna DyeEx (Qiagen) y se secuenciaron en un secuenciador de ADN automatizado Applied Biosystems 310.

Resultados:

Se obtuvieron secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de seis anticuerpos monoclonales que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, y las mismas se representan en las FIGS. 5 a 10. En particular, las FIGS. 5A, 6A, 7A, 8A, 9A y 10A representan las secuencias nucleotídicas que codifican las regiones de cadena ligera variable de los anticuerpos monoclonales 117.1, 368.1, 501.1, 776.1, 725.1 y 16H9, respectivamente, mientras que las FIGS. 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, y 10B representan las secuencias nucleotídicas que codifican las regiones de cadena pesada variable de los anticuerpos monoclonales 117.1, 368.1, 501.1, 776.1, 725.1 y 16H9, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias líder tienen un doble subrayado y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado.

Se obtuvieron secuencias de aminoácidos de las regiones variables de seis anticuerpos monoclonales que se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, y las mismas se representan en las FIGS. 5 a 10. En particular, las FIGS. 5C, 6C, 7C, 8C, 9C y 10C representan las secuencias de aminoácidos de las regiones de cadena ligera variable de los anticuerpos monoclonales 117.1, 268.1, 501.1, 776.1, 725.1 y 16H9, respectivamente, mientras que las FIGS. 5D, 6D, 7D, 8D, 9D y 10D representan las secuencias de aminoácidos de regiones de cadena pesada variable de los anticuerpos monoclonales 117.1, 368.1, 501.1, 776.1, 725.1 y 16H9, respectivamente. Las secuencias líder tienen un doble subrayado, y las secuencias CDR tienen un subrayado. Se observa que las secuencias líder no se convierten en parte de los anticuerpos maduros, y, como tales, no se consideran parte de las regiones variables de los anticuerpos.

6.7. Análisis western blot de sobrenadantes de OVCAR-3

El ejemplo de trabajo presentado en este documento proporciona un análisis western blot diseñado para someter a prueba directamente la capacidad de anticuerpos 368.1 ó 776.1 de unirse a CA 125/0772P desprendido. Los datos presentados en este documento demuestran directamente que ni el anticuerpo 368.1 ni el 776.1 reconocen las especies de alto peso molecular correspondientes al CA 125/0772P desprendido. Por el contrario, los anticuerpos

OC 125 y M11 sí reconocieron esta especie de alto peso molecular, mientras que la totalidad de los anticuerpos sometidos a prueba se unen fuertemente al polipéptido 0772P recombinante que contenía 3 repeticiones de control. De este modo, estos datos proporcionan una confirmación adicional de que los anticuerpos 368.1 y 776.1 se unen preferentemente al polipéptido CA 125/0772P asociado a células.

5 Métodos:

Los medios (RPMI complementado con suero bovino fetal al 10 %) de células OVCAR-3 cultivadas se extrajeron y se sustituyeron por medios complementados nuevos. Se extrajeron alícuotas de medios condicionados a 1 hora, 6 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas. Como instante 0 de tiempo se usaron medios complementados.

10 Un gel Bis-Tris (Invitrogen) del 4 al 12 % se cargó con 10 µl de medios condicionados de cada instante de tiempo y el mismo se separó por electroforesis durante 45 minutos a 200 voltios. Polipéptido de 3 repeticiones de 0772P purificado se cargó como positivo control a 100 ng, 10 ng y 1,0 ng.

15 Se transfirieron proteínas a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora al 30 voltios y a continuación se bloquearon durante la noche en leche desnatada a 4 °C. Anticuerpos primarios se llevaron hasta 400 µg/ml en PBS y a continuación se diluyeron 1:1.000 en leche desnatada (OC125 Dako n.ºM3519, M11 Dako n.ºM3520). Las transferencias se lavaron en PBS/Tween tres veces durante 10 minutos. El anticuerpo secundario (IgG anti-ratón, específico para Fc, Sigma n.ºB-7410) se diluyó 1:1.000 en leche desnatada y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron lavados tal como anteriormente. NeutraAvidin-HRP (Molecular Probes n.ºA-2664) se diluyó 1:1.000 en PBS/Tween y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las transferencias se lavaron en un volumen grande de PBS/Tween y se visualizaron por quimioluminiscencia (exposición de 30 segundos).

20

Resultados:

25 Para determinar si el cuerpo 368.1 ó 776.1 se une al polipéptido CA 125/0772P desprendido, se realizó un análisis western blot sobre el sobrenadante de células OVCAR-3 cultivadas, de las que se sabe que desprenden CA 125/0772P de su superficie. Dicho análisis somete a prueba la capacidad de los anticuerpos de unirse a CA 125/0772P desprendido directamente.

30 Tal como se muestra en la FIG. 11, los resultados del análisis western demuestran que ni el anticuerpo 368.1 ni el 776.1 reconocen la especie de alto peso molecular que se corresponde con el CA 125/0772P desprendido. Por el contrario, los anticuerpos M11 y OC 125, es decir, anticuerpos que no se unen preferentemente a CA 125/0772P asociado a células, sí que reconocieron esta especie de alto peso molecular. La totalidad de los cuatro anticuerpos sometidos a prueba se unen fuertemente al polipéptido 0772P recombinante que contiene 3 repeticiones de control, 3 repeticiones de 0772P, el cual contiene secuencias de dominio extracelular que son inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana del CA 125/0772P. De este modo, estos datos proporcionan una confirmación adicional de que los anticuerpos 368.1 y 776.1 se unen preferentemente al polipéptido CA 125/0772P asociado a células.

6.8. El anticuerpo 776.1 radiomarcado ralentiza el crecimiento tumoral

35 Los resultados presentados en este documento demuestran que el anticuerpo 776.1 radiomarcado ralentiza satisfactoriamente el crecimiento tumoral en un modelo animal para el cáncer de ovario humano.

Métodos:

Animales:

40 Para todos los estudios se usaron ratones hembra NCr nu/nu ("desnudos") (Taconic Farms, Germantown, N.Y.) de entre 6 y 7 semanas. A todos los animales se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*.

Implantación de células tumorales

45 Para estudios de eficacia, se usó la línea celular de carcinoma de ovario humano OVCAR-3 para el modelo de cáncer de ovario de humano. La línea OVCAR-3 (Hamilton, et al., Cancer Res. 43:5379-5389 (1983)) se obtuvo a partir de un adenocarcinoma de ovario de origen humano y se compró en ATCC (Catálogo n.º HTB-161). Células OVCAR-3 se mantuvieron en RPMI-1640 complementado con FBS al 10 % a 37 °C en CO₂ al 5 %. El OVCAR-3 expresa el CA 125/0772P asociado a tumor sobre la superficie celular. Se implantaron subcutáneamente semiinjertos de OVCAR-3 y los mismos se dejaron crecer como tumores ectópicos en ratones desnudos NCr inmunodeficientes. El criterio principal para el crecimiento tumoral de OVCAR-3 subcutáneo fue lograr tumores de entre 150 y 250 mm³ antes de dos semanas tras la implantación, momento en el cual comenzaría la terapia experimental.

50

Para facilitar la formación subcutánea del tumor, la línea OVCAR-3 se propagó en serie *in vivo* dentro de las cavidades peritoneales de ratones *nu/nu* NCr (Burbridge et al., Int. J. Oncol. 15: 1155-1162 (1999); Guichard et al., Clin. Cancer Res. 7:3222-3228 (2001)). Antes de la implantación subcutánea, se inyectaron i.p. en ratones *nu/nu* NCr (pase 1) 10 x 10⁶ células OVCAR-3 cultivadas *in vitro* (pase 32) en solución salina al 0,9 %. Siete semanas más

tarde, se recolectaron células tumorales por lavado peritoneal, y se inyectaron 5×10^6 células en un conjunto nuevo de receptores (pase 2). Cuatro semanas más tarde, las células se recolectaron por lavado peritoneal y se sometieron a un pase más, y 5×10^6 células se inyectaron en un conjunto nuevo de receptores (pase 3). Después de tres semanas, se recolectaron células del pase 3 y las mismas se sometieron a ensayo en relación con la viabilidad y la expresión del CA 125/0772P.

Para los estudios radioinmonoterapéuticos, se implantaron células del pase 3 para crecimiento subcutáneo del tumor. Las células del pase 3 eran de manera rutinaria $>95\%$ viables y conservaban niveles altos de expresión de CA 125/0772P según se confirmó por citometría de flujo. Para el crecimiento de tumor sólido, ectópico, se resuspendieron células a una concentración final de 15×10^6 células/ml en una mezcla de Matrigel (Matrigel, BD Biosciences: Lote n.º005002, 14,6 mg/mL) y solución salina al 0,9 %, siendo la concentración final de Matrigel de 7,3 mg/mL. Se inyectaron ratones con 0,2 ml de volumen de la suspensión celular para una dosis final de 3×10^6 células. Las suspensiones celulares se inyectaron subcutáneamente en el lado ventral del área abdominal usando una aguja de calibre 23. El sitio de inyección se dejó aséptico limpiándolo con gasa estéril en etanol al 70 %. Aproximadamente 10 días después de la implantación, se midieron tumores palpables con calibradores electrónicos (Fowler Instruments) a través de dos dimensiones perpendiculares. Los ratones se clasificaron en grupos de 10 basándose en el volumen del tumor. Para todos los grupos dentro de un estudio, no existieron diferencias significativas entre los volúmenes medios de los tumores. Dos veces por semana se registraron mediciones y observación de los tumores. El volumen de los tumores se calculó usando la fórmula convencional (Longitud x Anchura²) x 0,5.

20 **Acoplamiento del 776.1 a ¹³¹Iodo**

776.1 de IgG1 murino se yodó en Perkin-Elmer con el método IODO-GEN modificado (Visser et al., J. Nucl. Med. 42: 509-519 (2001)) que constituye unos medios eficaces de acoplar dosis elevadas de ¹³¹I a un anticuerpo monoclonal al mismo tiempo que minimizando los daños tanto químicos como los inducidos por radiación. A 10 mCi de ¹³¹I se le adicionaron diez microlitros de una solución 1,41 mg/ml de ácido ascórbico pH 5.0, y la mezcla se incubó durante un minuto. A esto le siguió la adición de 100 µl de fosfato 0,5 M, pH 7.4. A continuación, se adicionaron 0,5 mg de anticuerpo monoclonal 776.1 (calculado usando la concentración de anticuerpo para establecer el volumen requerido). A esto le siguió la adición de 35 µl de una solución 1 mg/ml de IODO-GEN en acetonitrilo. Después de una incubación de 3 minutos, se adicionaron 100 µl de una solución de ácido ascórbico (25 mg/ml, pH 5.0). Después de otros 5 minutos, se adicionaron 100 µl de seroalbúmina bovina (MSA) 0,1 % en PBS 50 mM. Después de otra incubación de 4 minutos, se analizó la incorporación de ¹³¹I mediante cromatografía en capa fina instantánea (ITLC) en solución salina normal. El yodo no incorporado se eliminó por separación usando cromatografía con Sephadex G-25 con columnas NAP-10 pre-llenadas (Amersham-Pharmacia) con PBS que contenía MSA 0,1 % como tampón. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente. Se analizó el anticuerpo monoclonal purificado en relación con el contenido de yodo libre nuevamente por ITLC, y el mismo se consideró adecuado si el yodo libre era $<5\%$ del yodo total presente.

35 **Inmunoreactividad del 776.1 radiomarcado, por ELISA**

Se determinó mediante el ensayo ELISA la inmunoreactividad del 776.1 radiomarcado. Placas de 96 pocillos Immulon 4 (Dynatech) se recubrieron con 100 µl por pocillo de 3 repeticiones de 0772P con una etiqueta (purificada por afinidad) de hemaglutinina (HA) a 1 µg/ml en DPBS durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con 200 µl por pocillo de tampón de bloqueo (1 x PBS con BSA al 1 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. 776.1 no marcado y radiomarcado se diluyó a 3 µg/ml en tampón de bloqueo y se adicionó a la primera fila de la placa bloqueada por triplicado a 150 µl por pocillo; a los pocillos restantes se les adicionó 100 µl de tampón de bloqueo. A continuación, los anticuerpos se diluyeron de forma seriada tres veces para un total de 7 diluciones. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente seguido por tres lavados con DPBS que contenía Tween-20 (PBST; 200 µl por pocillo) al 0,05 %. Para la detección de señales, a cada pocillo se adicionaron 100 µl de IgG anti-ratón de cabra, conjugada con HRP (Amersham-Biosciences Piscataway, NJ), diluida 1:2.000, y los mismos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBST, y el conjugado de HRP se detectó adicionando una mezcla de sustrato de TMB (KPL) y H₂O₂ (relación 1:1; 100 µl/pocillo). Las placas se incubaron durante 10 minutos, y se midió la absorbancia a 650 nm usando un lector de placas (Molecular Devices). Se determinó la inmunoreactividad comparando las concentraciones de anticuerpo radiomarcado y no marcado en las que se logró el 50 % de saturación.

50 **Radioinmunoterapia monodosis (RIT) con [¹³¹I]776.1**

A ratones portadores de tumores OVCAR-3 establecidos (comprendidos idealmente en volumen entre 150 mm³ y 250 mm³) se les administró una única inyección i.v. de [¹³¹I]776.1 (IgG₁ de ratón) en 0,2 ml de cloruro sódico al 0,9 %. Para todos los estudios, grupos de 10 ratones recibieron o bien 100 ó bien 300 µCi de [¹³¹I]776.1 en cloruro sódico al 0,9 %. Los grupos de control consistieron en ratones inyectados con cloruro sódico al 0,9 % solo o 776.1 no marcado en una dosis equivalente a la dosis de proteína proporcionada en el grupo de 776.1 radiomarcado con alta dosis. Los tumores se midieron dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor fue mayor que el 10 % de su peso corporal.

Resultados:

El anticuerpo IgG1 [¹³¹I]776.1, administrado como una única dosis intravenosa en un modelo de tumor de xenoinjerto de OVCAR-3 de cáncer de ovario humano, resultó eficaz en ralentizar el crecimiento tumoral en comparación con el control de IgG1 en tres estudios con los 300 µCi de dosis, y en dos de los tres estudios con los 100 µCi de dosis. Véase la FIG. 12 para obtener un resumen de uno de los estudios. En comparación con el control de solución salina, el IgG1 [¹³¹I]776.1 resultó eficaz en ralentizar el crecimiento tumoral en dos de los tres estudios con la dosis tanto de 100 µCi como de 300 µCi. En dos de los tres estudios, el IgG1 [¹³¹I]776.1 con la dosis de 300 µCi evidenció una regresión tumoral, definida como la consecución de un volumen medio del tumor menor que el volumen de partida del tumor en el comienzo del estudio. En un estudio, no se observó ninguna ralentización estadística del crecimiento tumoral para ningún grupo de tratamiento con IgG1 [¹³¹I]776.1 en comparación con el control de solución salina y no se observó ninguna regresión para el grupo de dosis de 300 µCi de IgG1 [¹³¹I]776.1. No obstante, los volúmenes medios de partida de los tumores en el comienzo de este estudio particular fueron significativamente mayores que en los dos estudios restantes.

Se obtuvieron resultados similares usando un anticuerpo radiomarcado con [⁹⁰Y]776.1. En particular, se observó una reducción significativa en el crecimiento tumoral ($p < 0,05$). En tres de cuatro estudios, se observó una reducción significativa del crecimiento en las dosis tanto de 50 µCi como de 150 µCi del anticuerpo. En estos mismos tres estudios, se observó una regresión del crecimiento tumoral a la dosis más alta de [⁹⁰Y]776.1, y el efecto sobre el crecimiento tumoral fue igual a, o mejor que 3 dosis de cisplatino 6 mg/kg.

7.0. Ensayos de competición de anticuerpos/fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos**20 Ensayo de competición cruzada ELISA**

Los anticuerpos que se van a someter a prueba se biotinilan usando el Kit de Biotinilación de Sulfo-NHS-LC EZ-Link (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), según las instrucciones del fabricante, seguido por eliminación de reactivo de biotinilación que no ha reaccionado, por diálisis contra 1 L de solución salina tamponada con fosfato con 2 cambios de tampón a 4 °C durante 48 horas. Placas de noventa y seis pocillos se recubren con 100 µl (por pocillo) de 1 µg/ml de 0772P de 3 repeticiones en tampón de bicarbonato (0,2 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,6, Sigma) durante la noche a 4 °C.

Al día siguiente, las placas se lavan tres veces con 200 µl 1 x PBST (1 x solución salina tamponada con fosfato (PBS), Tween 20 al 0,05 %) y se bloquean con 100 µl de 1 x PBST que contiene seroalbúmina bovina (BSA) al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con 1 x PBST, se obtiene una curva de titulación de 0 a 1.000 veces de exceso de anticuerpo competidor (con respecto al anticuerpo marcado adicionado en una etapa posterior) en 95 µl 1 x PBST + BSA 1 % que se adiciona a la placa en pocillos independientes y se incuba durante 1 hora a 37 °C. A continuación se adiciona anticuerpo biotinilado en 5 µl de 1 x PBST + BSA 1 %, y el mismo se incuba durante 1 hora adicional a temperatura ambiente. La concentración de anticuerpo biotinilado adicionado es aquella concentración a la cual se logra el 70 % de unión máxima de la proteína de 3 repeticiones de 0772P en ausencia de competidor usando las condiciones de detección que se describen posteriormente. La cantidad de anticuerpo adicionado depende de las características de la unión y se determina de manera rutinaria empíricamente en estudios piloto.

A continuación, las placas se lavan tres veces con 1 x PBST. Para la detección de señales, en cada pocillo se adicionan 100 µl de Estreptavidina-HRP (dilución 1:4.000-1:8.000 en 1 x PBST + BSA 1 %, Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, Alabama)), y los mismos se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación las placas se lavan tres veces con 1 x PBST. Finalmente, en cada pocillo se adicionan 100 µl de mezcla de sustrato de TMB y H₂O₂ (relación 1:1, KPL) y se mide la absorbancia a 405 nm con un lector de placas (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). El ensayo se realiza por triplicado para cada anticuerpo y se calculan valores promedio.

Se determina la competición no específica usando IgG1 de ratón normal en lugar de competidor específico. En cada experimento se incluyen también controles para reactivos blancos e individuales, así como autocompetición. El porcentaje de inhibición (menos competición no específica) se representa en función de la competición del competidor, y se determina la IC₅₀, o la concentración de competidor en la que se observa el 50 % de competición.

Ensayo de competición cruzada FACS

Los anticuerpos que se van a someter a prueba se biotinilan usando el Kit de Biotinilación de Sulfo-NHS-LC EZ-Link (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), según las instrucciones del fabricante, seguido por eliminación del reactivo de biotinilación que no ha reaccionado mediante diálisis contra 1 L de solución salina tamponada con fosfato con 2 cambios de de tampón a 4 °C durante 48 horas. Células OVCAR-3 cultivadas se recolectan y se lavan en tampón FACS (1 x solución salina tamponada con fosfato (DPBS) de Dulbecco, NaN₃ al 0,05 %, BSA 2 %). Se preparan ensayos de competición en placas de 96 pocillos en un volumen total de 50 µl.

Una titulación de entre 0 y 100 veces de exceso de anticuerpo competidor no marcado (con respecto al anticuerpo biotinilado adicionado en una etapa posterior) en 20 µl se adiciona a 25 µl de células OVCAR-3 (4×10^5)

suspendidas en tampón FACS (en pocillos independientes), se mezcla minuciosamente, se dispensa en una placa de 96 pocillos, y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, a cada pocillo que contiene células se le adicionan cinco microlitros de anticuerpo biotinilado en tampón FACS, los mismos se mezclan minuciosamente, y se incuban a temperatura ambiente durante unos 30 minutos adicionales. La cantidad de anticuerpo usada es la concentración mínima en la que se logra la unión máxima de células OVCAR-3, expresada como el porcentaje de células positivas. La cantidad de anticuerpo adicionada depende de las características de la unión y se determina de manera rutinaria empíricamente en estudios piloto.

A continuación las células se recogen y se lavan dos veces con 200 μ l de tampón de FACS. Para la detección de señales, las células se incuban con 50 μ l de 1 μ g/ml para estreptavidina conjugada con FITC (preparada con tampón de FACS, Molecular Probes, Eugene, OR) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavarlas dos veces con 200 μ l de tampón de FACS, a continuación células de pocillos individuales se resuspenden en 400 μ l de tampón de FACS y se someten a un análisis de FACS. El análisis de FACS se realizó según la recomendación del fabricante usando una instrumentación FACScan y un software CellQuest (Becton Dickinson). Los datos obtenidos en cada condición experimental se presentan 10.000. Para cada experimento se ejecutan también controles para reactivos blancos e individuales, y autocompetición. El porcentaje de inhibición (menos competición no específica), o la reducción en el porcentaje de células OVCAR-3 de tinción positiva, se representa en función de la competición del competidor, y se determina la IC_{50} , o la concentración de competidor a la que se observa un 50 % de competición.

Se considera que un anticuerpo compite si la IC_{50} para el competidor se sitúa en una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima del anticuerpo marcado. Más preferentemente, se considera que un anticuerpo compite si la IC_{50} para el competidor se sitúa en una concentración no mayor que aproximadamente 10 veces por encima del anticuerpo marcado. Más preferentemente, se considera que un anticuerpo compite si la IC_{50} para el competidor se sitúa en una concentración no mayor que aproximadamente equimolar al anticuerpo marcado.

8.0. Depósitos de hibridomas

El hibridoma 117.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 117.1 se depositó el 2 de agosto de 2002, con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC®), 10801 University Boulevard, Manassass, Virginia 20110-2209, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y se le asignó el número de accesión PTA-4567.

El hibridoma 368.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 368.1 se depositó el 2 de agosto de 2002, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y se le asignó el número de accesión PTA-4568.

El hibridoma 501.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 501.1 se depositó el 2 de agosto de 2002, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y se le asignó el número de accesión PTA-4569.

El hibridoma 776.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 776.1 se depositó el 2 de agosto de 2002, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y se le asignó el número de accesión PTA-4570.

El hibridoma 15C9 que secreta el anticuerpo monoclonal 15C9 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y se le asignó el número de accesión PTA-5106.

El hibridoma 16C7 que secreta el anticuerpo monoclonal 16C7 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y se le asignó el número de accesión PTA-5107.

El hibridoma 16H9 que secreta el anticuerpo monoclonal 16H9 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y se le asignó el número de accesión PTA-5108.

El hibridoma 4E7 que secreta el anticuerpo monoclonal 4E7 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y se le asignó el número de accesión PTA-5109.

El hibridoma 7A11 que secreta el anticuerpo monoclonal 7A11 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Euro-Celtique S.A.
- 5 <120> ANTICUERPOS QUE SE UNEN A CA 125/0772P ASOCIADO A CÉLULAS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS
- <130> 6750-214-228
- 10 <140> Se asignará
<141> 15-10-2003
- <150> 60/485,986
<151> 10-07-2003
- 15 <150> 60/418,828
<151>12-10- 2003
- <160> 71
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
<211> 748
<212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> 3 repeticiones de CA 125/0772P
- 30 <400> 1
Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr Lys Leu Phe Thr His
1 5 10 15
Arg Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Pro Thr Val Tyr
20 25 30
Leu Gly Ala Ser Lys Thr Pro Ala Ser Ile Phe Gly Pro Ser Ala Ala
35 40 45
Ser His Leu Leu Ile Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu
50 55 60
Arg Tyr Glu Glu Asn Met Trp Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr
65 70 75 80
Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser
85 90 95
Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu
100 105 110
Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro
115 120 125
Asp Pro Thr Gly Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu
130 135 140
Ser Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp
145 150 155 160
Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro
165 170 175
Thr Thr Ser Thr Gly Val Val Ser Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe
180 185 190
Thr Ile Asn Asn Leu Arg Tyr Met Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser
195 200 205
Leu Lys Phe Asn Ile Thr Asp Asn Val Met Lys His Leu Leu Ser Pro
210 215 220
Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu Gly Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg Val

ES 2 535 742 T3

225 230 235 240
 Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys Asn Gly Ala Glu Thr Arg Val Asp Leu
 245 250 255
 Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro Leu Ser Gly Pro Gly Leu Pro Ile Lys
 260 265 270
 Gln Val Phe His Glu Leu Ser Gln Gln Thr His Gly Ile Thr Arg Leu
 275 280 285
 Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys Asp Ser Leu Tyr Leu Asn Gly Tyr Asn
 290 295 300
 Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro Thr Thr Pro Lys Pro Ala Thr Thr
 305 310 315 320
 Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala Thr Thr Ala Met Gly Tyr His Leu
 325 330 335
 Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro
 340 345 350
 Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu
 355 360 365
 Gln His Leu Leu Arg Pro Leu Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe
 370 375 380
 Tyr Leu Gly Cys Gln Leu Ile Ser Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala
 385 390 395 400
 Ala Thr Gly Val Asp Thr Thr Cys Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly
 405 410 415
 Pro Gly Leu Asp Ile Gln Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr
 420 425 430
 His Gly Val Thr Gln Leu Gly Phe Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu
 435 440 445
 Phe Ile Asn Gly Tyr Ala Pro Gln Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr
 450 455 460
 Gln Ile Asn Phe His Ile Val Asn Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp Pro
 465 470 475 480
 Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Ile Gln Asp Lys Val
 485 490 495
 Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser Gln Leu His Asp Thr Phe Arg Phe Cys
 500 505 510
 Leu Val Thr Asn Leu Thr Met Asp Ser Val Leu Val Thr Val Lys Ala
 515 520 525
 Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp Pro Ser Leu Val Glu Gln Val Phe Leu
 530 535 540
 Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser Phe His Trp Leu Gly Ser Thr Tyr Gln
 545 550 555 560
 Leu Val Asp Ile His Val Thr Glu Met Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro
 565 570 575
 Thr Ser Ser Ser Thr Gln His Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr
 580 585 590
 Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp Lys Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr
 595 600 605
 Gln Arg Asn Lys Arg Asn Ile Glu Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg
 610 615 620
 Asn Ser Ser Ile Lys Ser Tyr Phe Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe
 625 630 635 640
 Arg Ser Val Pro Asn Arg His His Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn
 645 650 655
 Phe Ser Pro Leu Ala Arg Arg Val Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu
 660 665 670
 Phe Leu Arg Met Thr Arg Asn Gly Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu
 675 680 685
 Asp Arg Ser Ser Val Leu Val Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu
 690 695 700
 Pro Leu Thr Gly Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser
 705 710 715 720
 Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 725 730 735
 Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His His
 740 745

ES 2 535 742 T3

<210> 2
 <211> 809
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> 3 repeticiones TM de CA 125/0772P

10

<400> 2
 Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr Lys Leu Phe Thr His
 1 5 10 15
 Arg Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Pro Thr Val Tyr
 20 25 30
 Leu Gly Ala Ser Lys Thr Pro Ala Ser Ile Phe Gly Pro Ser Ala Ala
 35 40 45
 Ser His Leu Leu Ile Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu
 50 55 60
 Arg Tyr Glu Glu Asn Met Trp Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr
 65 70 75 80
 Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser
 85 90 95
 Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu
 100 105 110
 Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro
 115 120 125
 Asp Pro Thr Gly Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu
 130 135 140
 Ser Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp
 145 150 155 160
 Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro
 165 170 175
 Thr Thr Ser Thr Gly Val Val Ser Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe
 180 185 190
 Thr Ile Asn Asn Leu Arg Tyr Met Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser
 195 200 205
 Leu Lys Phe Asn Ile Thr Asp Asn Val Met Lys His Leu Leu Ser Pro
 210 215 220
 Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu Gly Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg Val
 225 230 235 240
 Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys Asn Gly Ala Glu Thr Arg Val Asp Leu
 245 250 255
 Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro Leu Ser Gly Pro Gly Leu Pro Ile Lys
 260 265 270
 Gln Val Phe His Glu Leu Ser Gln Gln Thr His Gly Ile Thr Arg Leu
 275 280 285
 Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys Asp Ser Leu Tyr Leu Asn Gly Tyr Asn
 290 295 300
 Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro Thr Thr Pro Lys Pro Ala Thr Thr
 305 310 315 320
 Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala Thr Thr Ala Met Gly Tyr His Leu
 325 330 335
 Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro
 340 345 350
 Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu
 355 360 365

ES 2 535 742 T3

Gln His Leu Leu Arg Pro Leu Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe
 370 375 380
 Tyr Leu Gly Cys Gln Leu Ile Ser Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala
 385 390 395 400
 Ala Thr Gly Val Asp Thr Thr Cys Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly
 405 410 415
 Pro Gly Leu Asp Ile Gln Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr
 420 425 430
 His Gly Val Thr Gln Leu Gly Phe Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu
 435 440 445
 Phe Ile Asn Gly Tyr Ala Pro Gln Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr
 450 455 460
 Gln Ile Asn Phe His Ile Val Asn Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp Pro
 465 470 475 480
 Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Ile Gln Asp Lys Val
 485 490 495
 Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser Gln Leu His Asp Thr Phe Arg Phe Cys
 500 505 510
 Leu Val Thr Asn Leu Thr Met Asp Ser Val Leu Val Thr Val Lys Ala
 515 520 525
 Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp Pro Ser Leu Val Glu Gln Val Phe Leu
 530 535 540
 Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser Phe His Trp Leu Gly Ser Thr Tyr Gln
 545 550 555 560
 Leu Val Asp Ile His Val Thr Glu Met Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro
 565 570 575
 Thr Ser Ser Ser Ser Thr Gln His Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr
 580 585 590
 Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp Lys Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr
 595 600 605
 Gln Arg Asn Lys Arg Asn Ile Glu Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg
 610 615 620
 Asn Ser Ser Ile Lys Ser Tyr Phe Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe
 625 630 635 640
 Arg Ser Val Pro Asn Arg His His Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn
 645 650 655
 Phe Ser Pro Leu Ala Arg Arg Val Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu
 660 665 670
 Phe Leu Arg Met Thr Arg Asn Gly Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu
 675 680 685
 Asp Arg Ser Ser Val Leu Val Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu
 690 695 700
 Pro Leu Thr Gly Asn Ser Asp Leu Pro Phe Trp Ala Val Ile Leu Ile
 705 710 715 720
 Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Ile Thr Cys Leu Ile Cys Gly Val
 725 730 735
 Leu Val Thr Thr Arg Arg Arg Lys Lys Glu Gly Glu Tyr Asn Val Gln
 740 745 750
 Gln Gln Cys Pro Gly Tyr Tyr Gln Ser His Leu Asp Leu Glu Asp Leu
 755 760 765
 Gln Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu
 770 775 780
 Gly Pro Arg Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Met
 785 790 795 800
 His Thr Gly His His His His His His
 805

- <210> 3
- 5 <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 535 742 T3

<220>
 <223> 117.1 VH1 CDR

5 <400> 3
 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro Gly Met Gly Val Gly
 1 5 10

<210> 4
 <211> 16
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 117.1 VH2 CDR

15 <400> 4
 His Ile Trp Trp Asp Asp Phe Lys Arg Asp Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 5
 20 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> 117.1 VH3 CDR

<400> 5
 Val Asp Gly Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

30 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> 117.1 VL1 CDR

<400> 6
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

40 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> 117.1 VL2 CDR

<400> 7
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 50 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 117.1 VL3 CDR

ES 2 535 742 T3

<400> 8
 Ser Gln Ser Arg Tyr Val Pro Glu Thr
 1 5

5 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 368.1 VH1 CDR

<400> 9
 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Phe Tyr Met His
 1 5 10

15 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 368.1 VH2 CDR

<400> 10
 Tyr Val Ser Cys Tyr Thr Gly Ala Thr Thr Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

25 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> 368.1 VH3 CDR

35 <400> 11
 Glu Gly Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Phe
 1 5

40 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 368.1 VL1 CDR

45 <400> 12
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Arg Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

50 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 368.1 VL2 CDR

55 <400> 13
 Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser
 1 5

60 <210> 14
 <211> 9

ES 2 535 742 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> 368.1 VL3 CDR

 <400> 14
 Ser Gln Thr Thr His Gly Pro Pro Thr
 1 5

 10 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> 501.1 VH1 CDR

 <400> 15
 Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Gly Met Asn
 20 1 5 10

 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 501.1 VH2 CDR

 30 <400> 16
 Cys Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ile Tyr Ser Asp Asp Phe Arg
 1 5 10 15
 Gly

 <210> 17
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 501.1 VH3 CDR

 40 <400> 17
 Gly Asn Tyr Arg Asp Ala Ile Asp Tyr
 1 5

 <210> 18
 45 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> 501.1 VL1 CDR

 <400> 18
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10

 55 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 742 T3

<220>
 <223> 501.1 VL2 CDR

 <400> 19
 Tyr Ala Thr Thr Leu Ala Asp
 5 1 5

 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 501.1 VL3 CDR

 15 <400> 20
 Leu His His Asp Glu Ser Pro Phe Thr
 1 5

 <210> 21
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 776.1 VH1 CDR
 25
 <400> 21
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Ile His
 1 5 10

 <210> 22
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> 776.1 VH2 CDR

 <400> 22
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe
 1 5 10 15

 40 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> 776.1 VH3 CDR

 <400> 23
 Arg Trp Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 50
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> 776.1 VL1 CDR

 <400> 24
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met Cys
 60 1 5 10

ES 2 535 742 T3

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 776.1 VL2 CDR

 10 <400> 25
 Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

 <210> 26
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 776.1 VL3 CDR

 20 <400> 26
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 1 5

 <210> 27
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> región variable polipeptídica de cadena ligera 117.1 (117.1L)

 <400> 27
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ser Gln Ser Arg Tyr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

 35 <210> 28
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> región variable polipeptídica de cadena pesada 117.1 (117.1H)

ES 2 535 742 T3

<400> 28

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

5

<210> 29

<211> 131

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> región variable polipeptídica de cadena ligera 368.1 (368.1L)

<400> 29

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

15

<210> 30

<211> 137

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> región variable polipeptídica de cadena pesada 368.1 (368.1H)

25

ES 2 535 742 T3

<400> 30

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

5

<210> 31

<211> 128

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> región variable polipeptídica de cadena ligera 501.1 (501.1L)

<400> 31

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

15

<210> 32

<211> 137

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> región variable polipeptídica de cadena pesada 501.1 (501.1H)

ES 2 535 742 T3

<400> 32

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

<210> 33

- 5 <211> 127
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- 10 <223> región variable polipeptídica de cadena ligera 776.1 (776.1L)

<400> 33

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

<210> 34

- 15 <211> 139
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>

- 20 <223> región variable polipeptídica de cadena pesada 776.1 (776.1H)

ES 2 535 742 T3

<400> 34

```

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

```

5 <210> 35
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> región variable polipeptídica de cadena ligera 117.1 (117.1L)

```

<400> 35
atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttggtc cagcagtgat 60
gctgtgatga cccaaactcc actctcctcg cctgtcagtc ttggagatca ggcctccatc 120
tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacac agtaatggaa acacctattt acattggtac 180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaaactc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caggatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtagata tgttccgtgg 360
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaatc aaa 393

```

15 <210> 36
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región variable polipeptídica de cadena pesada 117.1 (117.1H)

```

<400> 36
atgggcaggc ttacttcttc attcctgcta ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtcccag 60
gttactctga aagagtctgg ccttgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact 120
tgttctttct ctgggttttc actgagcact cctggatggt gtgtaggctg gattcgtcag 180
ccatcagggg agggctctgga gtggctggca cacatttggg gggatgattt caagcgcgat 240
aatccagccc ttaagagccg actgactatc tctaaggata cctccagcag ccaggttttc 300
ctcaaatcgy ccagtgtgga cactgcagat actgccacat attactgtgt tgcagtggat 360
ggtaacttcc tctcctggta tttcagatgc tggggcgctg ggaccacggt caccgtctcc 420
25 tca 423

```

<210> 37
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable polipeptídica de cadena ligera 368.1 (368.1L)

ES 2 535 742 T3

<400> 37
atgaagtgc ctggttaggct gttgggtgctg atgttctgga ttctctgcttc cagcagtgat 60
gtttgtgatga cccaaactcc actctcctcg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
tcttgcatgat ctagtccagag ccttgaacgc actaatggaa acacctatctt acattggtag 180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaaactc ctgatctaca aagtttccag ccgattttct 240
ggggtcccag ataggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagt 300
agagtggagg ctgaggatct gggaaattat ttctgttctc aaactacaca tggctcctccg 360
acgtgcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 393

5 <210> 38
<211> 411
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región variable polipeptídica de cadena pesada 368.1 (368.1H)

<400> 38
atgggatgga tctggatcct tctcttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
gtccagctgc agcagctctgg acctgagtta gtgaggactg gggcttcagt gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctggttactc attcactggg ttctacatgc actgggtcaa gcagagcctt 180
ggaaagagcc ttgagtggat tggatatggt agttgttaca ctgggtgctac tacctacacc 240
cagaagtcca agggcaaggc cacatttact gttgacacat cctccagcac agcctacatg 300
caactcaaca gcttgacatc tgaagactct gcggtctatt actgtgcaag agaaggggat 360
15 tactattcta tggacttctg gggcaagga acctcagtc cgtctctctc a 411

20 <210> 39
<211> 386
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> región variable polipeptídica de cadena ligera 501.1 (501.1L)

25 <400> 39
atggacatga gggccctgc tcagtttttt gggatcttgt tgctctgggt tccaggtatc 60
agatgtgaca tcaagatgac ccagctctcca tctgtccattt atgcatcgtc gggagagagg 120
gtcactataa cttgcaaggc gagtccaggac attaaaagct atttaagctg gtaccaacag 180
aaacctgga aatctcctaa gacctgac tattatgcaa caacctggc agatggggtc 240
ccatcaagat tcagtggcag tggatctggg caagattatt ctctaatcat caacagcctg 300
gagctgacg atatagctac ttatttctgt ctacaccatg atgagagccc attcagttc 360
ggctcgggga caaaattgga aataaa 386

30 <210> 40
<211> 411
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> región variable polipeptídica de cadena pesada 501.1 (501.1H)

35 <400> 40
atggcttggg tgtggacctt gctgttctcg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60
atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt ccagatctcc 120
tgcaaggctt ctggctatat cttcacagac tatggaatga actgggtgaa acaggctcca 180
ggaaagggtt taaaatggat gggctgtata aacacctaca ctggagagac aatatatagt 240
gatgacttca ggggacgggt tgcctctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctttatt 300
cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacgcg gcaacatatt tctgtgcaag gggaaattac 360
agggatgcta ttgactattg gggcaagga acctcagtc cgtctctctc a 411

40 <210> 41
<211> 383
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

ES 2 535 742 T3

<220>

<223> región variable polipeptídica de cadena ligera 776.1 (776.1L)

<400> 41

```

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
agaggacaaa ttgttctctc ccagtcctcca gcaatcctgt ttgcatctcc aggggagacg 120
gtcacaatga cttgcagggc cagttcaagt gtaatttaca tgggttgaa tcagcagaag 180
ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat ggcacatcca ccctggcttc tggagtccct 240
actcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtagag 300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaaccatt cacgttcggc 360
5   tcggggacaa agttggaaat aaa                               383
  
```

<210> 42

<211> 417

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable polipeptídica de cadena pesada 776.1 (776.1H)

15 <400> 42

```

atgggatgga gctggatcct tctcttctc ctgtcaggaa ctgcaggcgt ccactctgag 60
gtccagcttc agcagtcagg acctgagctg gtgaaacctg gggcctcagt gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctggatacac attcactgac tacaacattc actgggtgaa acagagccat 180
ggaaagatcc ttgagtggat tggatatatt tatccttata atgggtgttc tgactacaac 240
cagaatttca agagcaaggc cacattgatt gtagacaatt cctccaacac agcctacatg 300
gaactccgca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt attgtgcaag atgggacttc 360
ggtagtggct actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca    417
  
```

<210> 43

<211> 45

20 <212> RNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador (véase sección 6.6)

25

<400> 43

rcgacuggag cacgaggaca cugacaugga cugaaggagu agaaa 45

<210> 44

30 <211> 54

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> cebador (véase sección 6.6)

<400> 44

gctgtcaacg atacgctacg taacggcatg acagtgtttt tttttttt tttt 54

40 <210> 45

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> cebador (véase sección 6.6)

<400> 45

50 aytccacac acaggrcca gtggatagac 30

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> cebador (véase sección 6.6)

5 <400> 46
 ggatacagtt ggtgcagcat c 21

<210> 47
 <211> 23
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador (véase sección 6.6)

15 <400> 47
 cgactggagc acgaggacac tga 23

<210> 48
 <211> 20
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador (véase sección 6.6)

25 <400> 48
 attaaccctc actaaagga 20

<210> 49
 <211> 20
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador (véase sección 6.6)

35 <400> 49
 taatacgact cactataggg 20

<210> 50
 <211> 20
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador (véase sección 6.6)

<400> 50
 50 attaaccctc actaaagga 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador (véase sección 6.6)

<400> 51
 60 taatacgact cactataggg 20

<210> 52
 <211> 383
 <212> DNA
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 535 742 T3

<220>

<223> región variable polipeptídica de cadena ligera 725.1 (725.1L)

<400> 52

5 atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttattctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120
 gtcacaatga cttgcagggc cagttcaagt gtaagtcca ttactggta ccagcagaag 180
 ccagaatcct cccccaacc ctggatttac gccacatcca acctggcttc tggagtccct 240
 gttcgcttca gtggcagtggt gtctgggacc tcttatactc tcacaatcag cagaatggag 300
 gctgcagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta ttgatccagc cacgttcgga 360
 ggggggacca agctggaaat aaa 383

<210> 53

<211> 135

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> región variable polipeptídica de cadena pesada 725.1 (725.1H)

15

<400> 53

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

<210> 54

20 <211> 127

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> región variable polipeptídica de cadena ligera 725.1 (725.1L)

<400> 54

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

30

ES 2 535 742 T3

<210> 55
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> región variable polipeptídica de cadena pesada 16H9 (16H9H)

<400> 55
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp
 65 70 75 80
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Val Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Asp Ile Tyr Tyr Gly Asn Pro Gly Gly Phe
 115 120 125
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

10

<210> 56
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> región variable polipeptídica de cadena ligera 16H9 (16H9L)

<400> 56
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60
 Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 65 70 75 80
 Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95
 Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
 100 105 110
 Gln Tyr His Arg Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ile

20

<210> 57
 <211> 406
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> región variable polipeptídica de cadena pesada 725.1 (725.1H)

30

ES 2 535 742 T3

<400> 57
atggccttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60
atccagttgg tgcagtctgg acctgaactg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120
tgcaaggctt ctggatattc cttcacaaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca 180
gggaagggtt taaagtggat gggctggata aacgcctaca ttggagagcc aacatatgct 240
gatgacttca agggacgatt tgccttctct ctggaagcct ctaccacac tgcctatttg 300
cagatcaaca gcctcaaaag tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag tgggggtaac 360
tcccttgact tttggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcag 406

5 <210> 58
<211> 423
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> región variable polipeptídica de cadena pesada 16H9 (16H9H)

<400> 58
atgaaatgca gctggggttat cttcttcctg atggcagtg ttacaggggt caattcagag 60
gttcagctgc agcagctctgg ggcagagctt gtgaagccag gggcctcagt caagttgtcc 120
tgcacagctt ctggcttcaa cattaagac acctatatgc actgggtgaa gcagaggcct 180
gaacagggcc tggagtggat tggaaggatt gatcctgcga atggtaatac taaatatgac 240
ccgaagtcc agggcaaggc cactataaca gcagacacat cctccaacac agcctacgtg 300
cagctcagca gcctgacatc tgaggacact gccgtctatt actgtgctag tagtgacatc 360
tactatggta accccggggg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 420
gca 423

15 <210> 59
<211> 389
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> región variable polipeptídica de cadena ligera 16H9 (16H9L)

<400> 59
atggatttcc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60
agaggacaaa ttgttctcac ccagctctcca gcaatcatgt ctgcatctct aggggaacgg 120
gtccacatga cctgcactgc cagctcaagt gtaagttcca gttacttgca ctggtaccag 180
cagaagccag gatcctcccc caaactctgg atttatagca catccaacct ggcttctgga 240
gtcccagctc gcttcagtg gctcagtggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc 300
atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccaccagt atcatcgttc cccattcagc 360
ttcggctcgg ggacaaagtt ggaataaaa 389

25 <210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> 725.1 VH1 CDR

<400> 60
Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
35 1 5 10

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> 725.1 VH2 CDR

ES 2 535 742 T3

<400> 61
 Trp Ile Asn Ala Tyr Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

5 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 725.1 VH3 CDR

<400> 62
 Gly Gly Asn Ser Leu Asp Phe
 1 5

15 <210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 725.1 VL1 CDR

<400> 63
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile His
 1 5 10

25 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> 725.1 VL2 CDR

<400> 64
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

35 <210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> 725.1 VL3 CDR

45 <400> 65
 Gln Gln Trp Ser Ile Asp Pro Ala Thr
 1 5

50 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> 16H9 VH1 CDR

<400> 66
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His
 1 5 10

ES 2 535 742 T3

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> 16H9 VH2 CDR
<400> 67
Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15
10 Gly
<210> 68
<211> 13
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> 16H9 VH3 CDR
20 <400> 68
Ser Asp Ile Tyr Tyr Gly Asn Pro Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 69
<211> 12
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> 16H9 VL1 CDR
30 <400> 69
Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10
35 <210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
40 <223> 16H9 VL2 CDR
<400> 70
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
45 <210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
50 <220>
<223> 16H9 VL3 CDR
<400> 71
His Gln Tyr His Arg Ser Pro Phe Thr
1 5
55
60

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, en donde un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, en un Ensayo de Competición por Citometría por Flujo, presenta una IC_{50} , según se mide por porcentaje de células positivas, de por lo menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos, esto es, si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, requiere al menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría por Flujo a la mitad, y en donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une a la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1.
2. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Competición ELISA, presenta menos que un $25 \pm 2,5\%$ de inhibición de unión al péptido de la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1 en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/0772P desprendido, con respecto al péptido de la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1.
3. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une al péptido de la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1, aunque no se une de manera detectable al CA 125/0772P desprendido.
4. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.
5. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única, un F_v s con enlace disulfuro, un F_v s de cadena única, o un anticuerpo anti-idiotipo.
6. El fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la reivindicación 1, en el que el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento que contiene VL, un fragmento que contiene VH, o un fragmento que contiene una región determinante de complementariedad (CDR).
7. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en el ID SEC N.º:27, ID SEC N.º:29, ID SEC N.º:31, ID SEC N.º:33, ID SEC N.º:54 ó ID SEC N.º:56.
8. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en el ID SEC N.º:28, ID SEC N.º:30, ID SEC N.º:32, ID SEC N.º:34, ID SEC N.º:53 ó ID SEC N.º:55.
9. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena del anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8.
10. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une al péptido de la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1 con una K_d menor que 100 ± 10 nM según se mide en un Ensayo de Afinidad BIAcore.
11. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos está modificado por sustitución, supresión, o adición de aminoácidos, o una combinación de las mismas, y tiene una afinidad igual o aumentada para el CA 125/0772P asociado a células con respecto a la de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos no modificado correspondiente.
12. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos está modificado por sustitución, supresión, o adición de aminoácidos, o una combinación de las mismas, y en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos presenta una semivida sérica igual o aumentada en comparación con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos no modificado correspondiente y se une a una región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1.
13. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo media la lisis de una célula tumoral positiva para el CA 125/0772P en un ensayo de ADCC.

14. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo media la lisis de una célula tumoral positiva para el CA 125/0772P en un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

5 15. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo inhibe un crecimiento tumoral positivo para el CA 125/0772P.

10 16. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, en donde un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, en un Ensayo de Competición por Citometría por Flujo, presenta una IC_{50} , según se mide por porcentaje de células positivas, de por lo menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos, esto es, si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, requiere al menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría por Flujo a la mitad, y en donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une a la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 17. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo monoclonal de unión a antígenos que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, en donde un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, en un Ensayo de Competición por Citometría por Flujo, presenta una IC_{50} , según se mide por porcentaje de células positivas, de por lo menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos, esto es, si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, requiere al menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría por Flujo a la mitad, y en donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une a la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 18. Un artículo fabricado que comprende un material de envasado y una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, en donde un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, en un Ensayo de Competición por Citometría por Flujo, presenta una IC_{50} , según se mide por porcentaje de células positivas, de por lo menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos, esto es, si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, requiere al menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría por Flujo a la mitad, y en donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une a la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, contenidos en el material de envasado, dicha composición farmacéutica en una forma adecuada para administrar a un paciente.

25 19. Un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, en donde un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, en un Ensayo de Competición por Citometría por Flujo, presenta una IC_{50} , según se mide por porcentaje de células positivas, de por lo menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos, esto es, si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, requiere al menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría por Flujo a la mitad, y en donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une a la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1 enlazado operativamente a un agente heterólogo.

30 20. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, en donde un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, en un Ensayo de Competición por Citometría por Flujo, presenta una IC_{50} , según se mide por porcentaje de células positivas, de por lo menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos, esto es, si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, requiere al menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/0772P desprendidos para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría por Flujo a la mitad, y en donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une a la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1 para usar en el tratamiento contra el cáncer, preferiblemente cáncer de ovario.

35 21. Un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, en donde un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, en un Ensayo de Competición por Citometría por Flujo, presenta una

5 IC₅₀, según se mide por porcentaje de células positivas, de por lo menos 0,05±0,005 mg/ml de CA 125/0772P desprendidos, esto es, si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, requiere al menos 0,05±0,005 mg/ml de CA 125/0772P desprendidos para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría por Flujo a la mitad, y en donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une a la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1, que comprende:

10 (a) incubar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos con un péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células en presencia de CA 125/0772P desprendido en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos a dicho péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células o CA 125/0772P desprendido;

(b) retirar el CA 125/0772P desprendido y anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos no unido a dicho péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células;

(c) medir la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos unido a dicho péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células; y

15 (d) comparar la cantidad en (c) con la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une a dicho péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células en ausencia del CA 125/0772P desprendido.

20 22. Un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, en donde un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, en un Ensayo de Competición por Citometría por Flujo, presenta una IC₅₀, según se mide por porcentaje de células positivas, de por lo menos 0,05±0,005 mg/ml de CA 125/0772P desprendidos, esto es, si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, requiere al menos 0,05±0,005 mg/ml de CA 125/0772P desprendidos para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría por Flujo a la mitad, y en donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une a la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1, que comprende:

30 (a) hacer entrar en contacto un anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con un péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células en presencia de CA 125/0772P desprendido, en condiciones que permiten la unión del péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos;

(b) retirar el péptido no unido que comprende CA 125/0772P asociado a células;

(c) medir la cantidad de péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células al que se ha unido el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, y

35 (d) comparar la cantidad medida en (c) con la cantidad de péptido que comprende CA 125/0772P asociado a células al que se une el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en ausencia del CA 125/0772P desprendido.

40 23. Un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células, en donde un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, preferentemente se une a CA 125/0772P asociado a células si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, en un Ensayo de Competición por Citometría por Flujo, presenta una IC₅₀, según se mide por porcentaje de células positivas, de por lo menos 0,05±0,005 mg/ml de CA 125/0772P desprendidos, esto es, si el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, requiere al menos 0,05±0,005 mg/ml de CA 125/0772P desprendidos para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría por Flujo a la mitad, y en donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une a la región repetitiva representada por los aminoácidos 14-452 dentro del ID SEC N.º:1, que comprende:

(a) hacer entrar en contacto un anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con una célula que expresa CA 125/0772P en presencia de una cantidad de CA 125/0772P desprendido, en condiciones que permiten la unión del CA 125/0772P al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos;

50 (b) eliminar células no unidas;

(c) medir la cantidad de células que expresan CA 125/0772P a las que se ha unido el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, y

(d) comparar la cantidad medida en (c) con la cantidad de células que expresan CA 125/0772P que se une al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en ausencia de dicha cantidad de CA 125/0772P desprendido.

24. Un hibridoma que puede secretar un anticuerpo de la reivindicación 1.

5 25. El anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígenos de la reivindicación 1, conjugado a un agente citotóxico.

26. La composición farmacéutica de la reivindicación 16 ó 17, en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos está conjugado a un agente citotóxico.

27. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos está conjugado a un agente citotóxico.

10

FIG. 1

1 AAQPARRARR TKLFTRSSV STTSTPGTPT VYLGASKTPA SIFGPSAASH
 51 LLILFTLNFT ITNLRYEEM WPGSRKFNIT ERVLQGLLRP LFKNTSVGPI
 101 YSGRLILLR PEKDGKATGV DAICTHRPDP TGPGLDREQL YLELSQLTHS
 151 ITELGPYILD RDSLYVNGFT HRSSVPTTST GVVSEEPFLL NFTINLRIM
 201 ADMGQPGSLK FNITDVMKX LLSPLQKSS LGARYTQCRV IALRSVAKGA
 251 ETRVDLLCTY LQPLSGPGLP IKQVFHLSQ QTHGITRLGP YSLDKDSLVL
 301 NGYNEPGPDE PPTTPKPATT FLPLSEATT ANGYHLATLT LNFTISNLQY
 351 SPDMGKGSAT FNSTEGVLQH LLRPLFKSS MGPFFYLGQOL ISLRPDKGA
 401 ATGVDITCTY HPDÉVGPGLD IQQLYNELSQ LYEGVTQLGF YVLDKDSLFI
 451 ~~NGYAPONLSI RGEYKINERI VNMNLSNDR TSSEKILLR DIQKVTLLY~~
 501 ~~KGSQLEDTFR FCLVTLNLMQ SVLYTKKALF SSNLDPSLYE OVFLDKTINA~~
 551 ~~SFRMLGSTYO LYDINVTENE SEVYQFTSSS STOHPIINFT ITHLEYSODK~~
 601 ~~AQRTINXOR NKRKLEDAIM OLFNRSIKS YFEDQVSTF RSVENREHNG~~
 651 ~~YDSICNESEL ARRYDRVAIX EEFLMTRNG TOLONETLDR SSVLVGQYFR~~
 701 NRNEPLTGNB ADIQHSGRS SLEGPRTQK LISPEELNMB TGHHRER

FIG. 2.

1 AAQPARRARR TKL¹⁻THRSSV STTSTGPTT VYLGASKTPA SIRGSAASH
51 LLLLETLNFT ITNLYEEM WFGSRKNTT ERVLOGLLRP LFONTSYGEL
101 YSGRLTLR PFKDGEATGV DAICTHEDP YGGLDREOL YLELSOLTHE
151 ITELGETLD RDSLYNGET HRSVPTTST GVSREPETL NETINLRYM
201 AMGQRGSLK ENLIDNMMH LLSPLFORSS LGARYTGRV IALRSVQGA
251 ETRVDLLCTY LQPLSGRGLP INQVHLSO QVETIRLGP YSLQDLSYL
301 NGYNERGEDE PETPKPATT FLPELSEATT AMGYHLKTLT INELISNLOX
351 SPOMGKSAT FNTYGVLOH LLRELFORSS NGPEYLGQOL ISLRPERDGA
401 ARGVDTRCTY HEDYVERGLD IOOLYHLSO LTRGVTLGF YVLDRESLEY
451 NGAPONLSI RGEYQINEFI VNNLSNEDP TSSEYITLLR DIQDXYTLY
501 KGSOLHDTFR FGLVTLNLTMD SYLVYKALY SSNLDPSLVE QVFLDKLNA
551 SFHWLGSYQ LYDIHYTEME SSVYOPTSSS STQHYLNFT ITNLYSODK
601 AOPGTTNYOR NRRNIEDALN OLFERNSSIKS YFSDQVSTF RSVKSRBTG
651 VDSLKRFEL ARVDRVAYY EEFLEMTNG TOLONFTLOR SSVLYQGYF
701 NRRNPLRNS DLFFNAVILI GLAGLLGLIT CLICGVLVF RRRKREGEN
751 VQCCPGYTO SHLDLEDON SADIQHSGR SSLEQRFED KLISZEDLNM
801 RTGHHHHH

FIG. 3

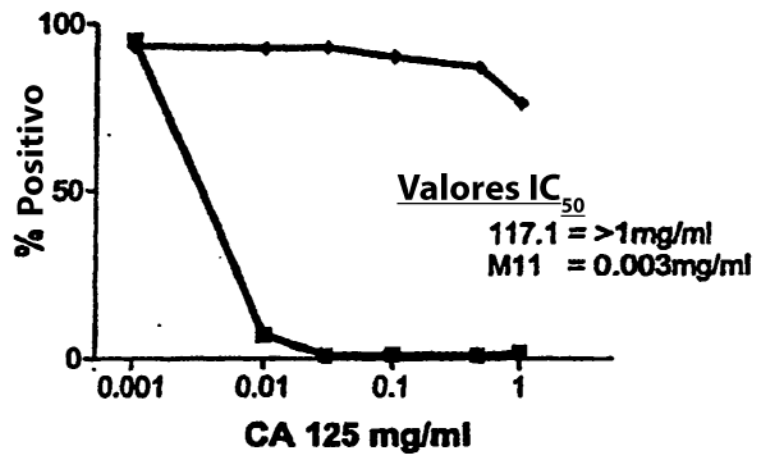


FIG. 4

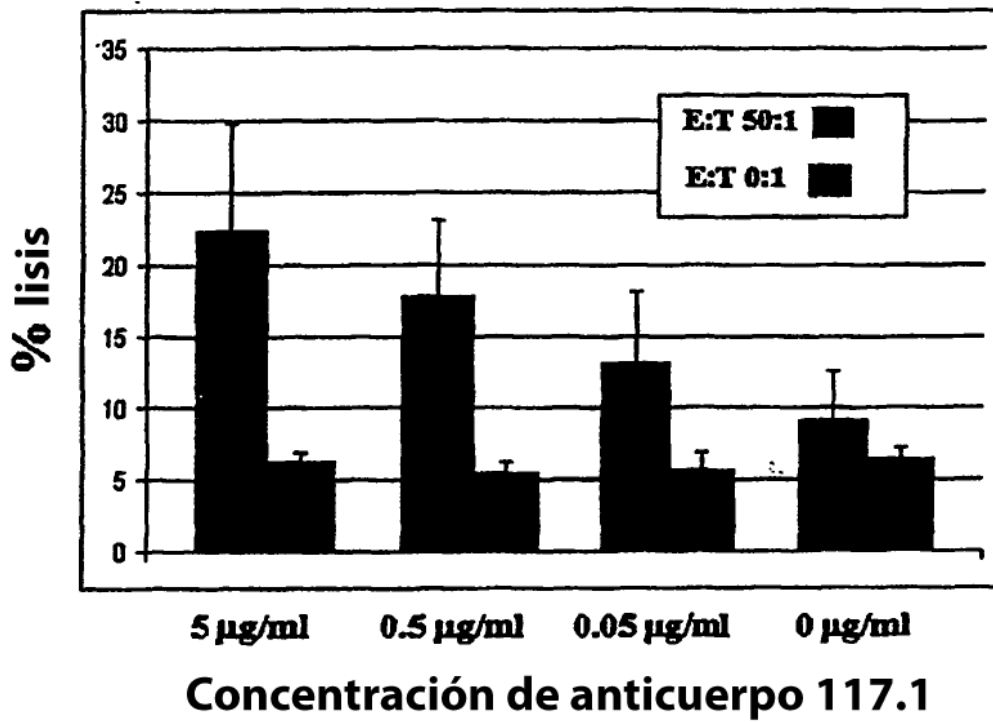


FIG. 5A

Cadena ligera 117.1:

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGGCTGATGTTTCGGATTCCTGGTTCAGCA
GTGATGCTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
GGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACC
TATTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAACTCCTGATCTACA
AAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGG
GACAGATTCACACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTA
TTCTGCTCTCAAAGTAGATATGTTCCGTTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTG
GAAATCAA

FIG. 5B

Cadena pesada 117.1:

ATGGGCAGGCTTACTTCTTCAATTCCTGCTACTGATGTGCCCTGCATATGTCCTGTC
CCAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATGTCAGCCCTCCAGACCCCTC
AGTCTGACTTGTCTTTCTCTGGGTTTCACTGAGCACTCCCTGGTATGGGGTGTAGG
CTGGATTCGTCAGCCATCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGGTG
GGATGATTTCAAGCCGATAATCCAGCCCTTAAGAGCCGACTGACTATCTCTAAG
GATACTCCAGCAGCCAGGTTTTCTCAAATCGCCAGTGTGGACACTGCAGATA
CTGCCACATATTACTGTGTTGAGTGGATGGTAACTTCCCTCTCCCTGGTATTTCGAT
GTCTGGGGCGCTGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

FIG. 5C

Cadena ligera 117.1:

MKLPVRLLVLMFWIPGSSSDAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSOSLVHSNQNLYL
HWYLQKPGQSPKLLIYKVSINRFSGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEAEDLGVYFCSQS
RYVPWTFGGGTKLEIK

FIG. 5D

Cadena pesada 117.1:

MGRLTSSPELLIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGESLSTPGMGVQWIR
QPSGKGLEWLAHIWWDDEKRDNPALKSRLTISKDTSSSQVFLKIASVDTADTATYYC
VRVDGNFLSWYFDYWGAGTIVTVSS

FIG. 6A

Cadena ligera 368.1:

ATGAAGTTGCCGTGTTAGGCTGTTGGTGGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCAGCAG
TGATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCGTGCAGTCTTGGAGATCAA
GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCCTTGAACGCACTAATGGAAACACCT
ATLACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAACCTGATCTACAA
AGTTCCAGCCGATTTCTGGGGTCCAGATAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGG
ACAGATTCACACTCAAGATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATT
TCTGTCTCAAACCTACACATGGTCCCTCCGACCTGCCGTTGGAGGCACCAAGCTGGA
AATCAAA

FIG. 6B

Cadena pesada 368.1:

ATGGGATGGATCTGGATCTTCTCTTCCCTGTCAGGAACTGCAGGRTCCACTC
TGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTAGTGAGGACTGGGGCTTCAGT
GAAGATACTCTGCAAGGCTTCTGGTACTCATTCAGTGGTTCTACATGCACTGG
GTCAAGCAGAGCCTTGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATGTTAGTTGTTACA
CTGGTGTACTACTACACCCAGAAGTCAAGGGCAAGGCCACATTTACTGTTGA
CACATCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGAAGACTCT
GOGGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGGGGATTACTATTCTATGGACTTCTGGGGTC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCA

FIG. 6C

Cadena ligera 368.1:

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSOSLERTNGNTYLH
WYLQKPGQSPKLLIYKVSSRFSGVPDFRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLGIYFCSTTH
GPPTCGGGTKLEIK

FIG. 6D

Cadena pesada 368.1:

MGWIWIELELLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVRTGASVKISCKASGYSETGFYMHWV
KQSLGKSLEWIGYVSCYTGATTYTOKEFKGKATFTVDTSSSTAYMQLNSLTSEDSAVY
YCAREGDYYSMDRFWGGQTSVTVSS

FIG. 7A

Cadena ligera 501.1:

**ATGGACATGAGGGCCCTGCTCAGTTTTTGGGATCTTGTGCTCTGGTTCCAGG
TATCAGATGTGACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCGTCCATTTATGCATCGCTG
GGAGAGAGGGTCACTATAACTTGC AAGGCGAGTCAGGACATTA AAAAGCTATTA
AGCTGGTACCAACAGAAACCCTGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATTATGCAA
CAACCTTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGATT CAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAG
ATTATTCTTAATCATCAACAGCCTGGAGTCTGACGATATAGCTACTTATTTCTGT
CTACACCATGATGAGAGCCCATTCACGTT CGGCTCGGGGACAAAATTGAAATA
AA**

FIG. 7B

Cadena pesada 501.1:

**ATGGCTGGGGTGTGGACCTTGCCTGCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGCCCAAG
CACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAG
TCCAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATATCTTCACAGACTATGGAATGAACTG
GGTGAACAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAATGGATGGGCTGTATAAACACCTA
CACITGGAGAGACAATATATAGTGTGACTTCAGGGGACGGTTTGCCATCTCTTTG
GAAACCTCTGCCAGCACTGCCITTTATTCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACG
CGGCAACATATTTCTGTGCAAGGGGAAATTACAGGGATGCTATTGACTATTGGGG
TCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA**

FIG. 7C

Cadena ligera 501.1:

**MDMRAPAOEFGILLWEPGIRCDIKMTQSPSSIYASLGERVTTTCKASODIKSYLSWY
QKFPWKSPKTLIYYATTLADGVPSRFSGSGSQDYSLIINSLESDDIATYFCLHDESP
EIFGSGTKLEI**

FIG. 7D

Cadena pesada 501.1:

**MAVWVTLLELMAAAQSAQAQIQLVQSGPBLKPKGETVQISCKASGYIETDYGMNW
VKQAPGKGLKWMGCINTYTGELIYSDDFRGRFAISLETSASTAFIQINNLKNEDAATY
FCARGNYRDAIDYWGQGTSVTVSS**

FIG. 8A

Cadena ligera 776.1:

ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGGCTTCAGTCATAAT
GTCCAGAGGACAAATGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAATCCTGTTTGCATCTCCA
GGGGAGACGGTCAATGACTTGCAGGGCCAGTTCAAGTGTAAATTTACATGTGT
GGAATCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCCTGGATTTATGGCACATCCA
CCCTGGCTTCTGGAGTCCCTACTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTA
CTCTCTCAAATCAGCAGAGTAGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAG
CAGTGGAGTAGTAAACCATTACGTTCTGGCTCGGGGACAAAGTTGAAATAAA

FIG. 8B

Cadena pesada 776.1:

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCTCTGTCAGGAACTGCAGGGCGTCCACT
CTGAGGTTCCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAACCTGGGGCCTCAG
TGAAGATATCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACAACATTCAGT
GGTGAACAGAGCCATGGAAAGATCCTTGAGTGGATTGGATATATTTATCTTAT
AATGGTGTCTGACTACAACCAGAATTTCAAGAGCAAGGCCACATTGATTGTAG
ACAATTCCTCCAACACAGCCTACATGGAACCTCCGACGCCTGACATCTGAGGACTC
TGCAGTCTATTATTGTGCAAGATGGGACTTCGGTAGTGGCTACTACTTTGACTAC
TGGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCTCA

FIG. 8C

Cadena ligera 776.1:

MDEOVOIESSELLISASVIMSRGQIVLSQSPAILFASPGETVTMTCRASSSVTYMCWNQQ
KPGSSPKPWYGTSLASGVPTRFSGSGSGTYSLSLTSRVEAEDAATYYCQOWSSNPF
TFGSGTKLBI

FIG. 8D

Cadena pesada 776.1:

MGWSWIEFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTETDYN
HWVKQSHGKILEWIGYIYPYNGVSDYDNONEFKSKATLIVDNSSNTAYMELRSLTSEDS
AVYYCARWDFGSGYFEDYWGQGTTLTVSS

FIG. 9A

725.1 LC

ATGGATTTCCAAGTGCAGATTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAAT
GTCCAGAGGCAAATTATTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCA
GGGAGAAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGTTCAGTGTAAAGTTCATTAC
TGGTACCAGCAGAAGCCAGAATCCTCCCCAAACCCTGGATTTACGCCACATCCA
ACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTTAT
ACTCTACAATCAGCAGAATGGAGGCTGCAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGC
AGTGGAGTATTGATCCAGCCACGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA

FIG. 9B

725.1 HC

ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGCCCAAG
CACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAACTGAAGAAGCCTGGAGAGACAG
TCAAGATCTCTGCAAGGCTTCTGGATATTCCTTCACAAACTATGGAATGAACTG
GGTGAAGCAGGCTCCAGGGAAGGGTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACGCCTA
CATTGGAGAGCCAAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGATTTGCCTTCTCTG
GAAGCCTCTACCCACACTGCCTATTTGCAGATCAACAGCCTCAAAAGTGAGGAC
ACGGCTACATATTTCTGTGCAAGTGGGGGTAACTCCCTTGACTTTTGGGGCCAAG
GCACCACTCTCACAGTCTCCTCAG

FIG. 9C

725.1 LC

MDFOVOIPESELLISASVMSRQOILSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSYSSIHWYQQK
PESSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYTLTISRMEAADAATYYCOOWSIDPAT
FGGGTKLEI

FIG. 9D

725.1 HC

MAWVWTLLEFLMAAAOQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYSEFTNYGMNW
VKQAPGKGLKWMGWINAYIGEPTYADDFKGRFAFSLEASTHTAYLQINSLKSEDTA
TYFCASGGNSLDFWGQGTTLTVSS

FIG. 10A

16H9 LC

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAAT
GTCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTA
GGGGAACGGGTACCCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTCCAGTACT
TGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACTCTGGATTTATAGCAC
ATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACC
TCTTACTCTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACT
GCCACCAGTATCATCGTTCCCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAAT
AAA

FIG. 10B

16H9 HC

ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAATT
CAGAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAG
TCAAGTTGTCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACCTG
GGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGC
GAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGC
AGACACATCTCCAACACAGCCTACGTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA
CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGTAGTGACATCTACTATGGTAACCCCGGGGG
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

FIG. 10C

16H9 LC

MDEQVOIESELLISASVIMSRGQIVLTQSPAIMASALGERVTMTCTASSVSSSYLHWY
QKQPGSSPKLWYSTSNLASGVPARFSGSGSSTSYSLTISSMEABDAATYYCHOYHRS
PEIFGSGTKLEI

FIG. 10D

16H9 HC

MKCSWVIFELMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGENIKDTYMHW
VKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFOGKATTADTSSNTAYVQLSSLTSEDYAV
YYCASSDIYYGNPGGFAYWGQGLVTVSA

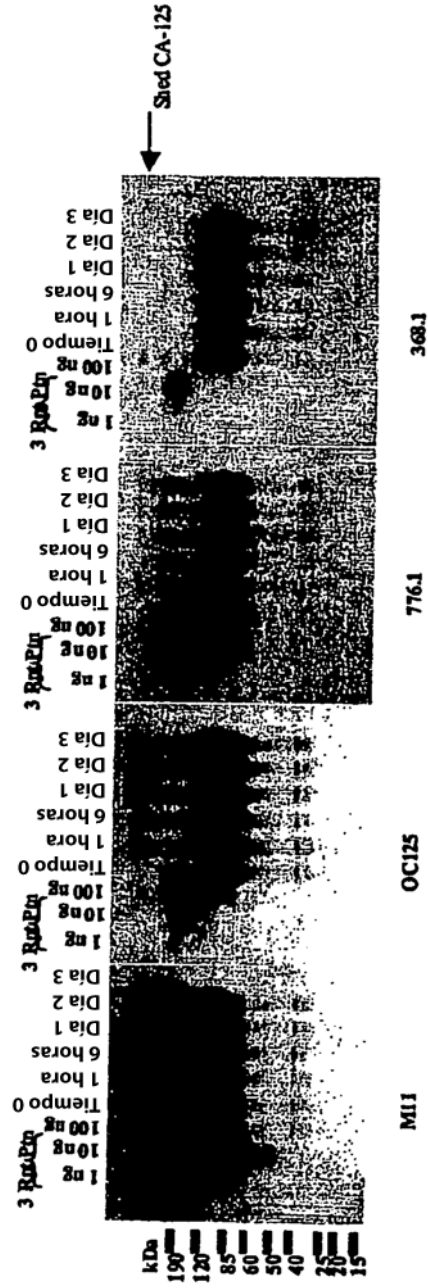


Figura 11

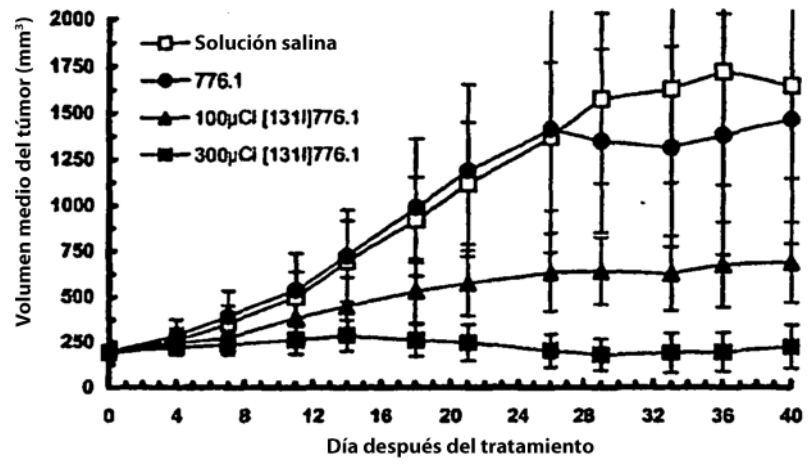


Figura 12