

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 350**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2007** **E 07868854 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015** **EP 2104513**

54 Título: **Composiciones de anticuerpos de Ovr110 y métodos de uso**

30 Prioridad:

27.11.2006 US 861657 P

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

18.08.2015

73 Titular/es:

DIADEXUS, INC. (100.0%)
349 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

PAPKOFF, JACKIE;
DIEDRICH, GUNDO;
LIU, SHU-HUI y
NOWAKOWSKI, AGNES

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 543 350 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de anticuerpos de Ovr110 y métodos de uso

- 5 La presente solicitud de patente reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº de Serie 60/861.657, presentada el 27 de noviembre de 2006.

Campo de la invención

- 10 La invención se refiere a anticuerpos anti Ovr110. Además, la invención se refiere a inmunoconjugados, moléculas biespecíficas, composiciones, moléculas de ácido nucleico, vectores de expresión, células hospedadoras, ratones transgénicos, hibridomas, células, usos médicos y métodos *in vitro* que se refieren a anticuerpos anti Ovr110.

Antecedentes de la invención

- 15 Cáncer ovárico

- El cáncer de los ovarios es la cuarta causa más común de muerte por cáncer en mujeres en los Estados Unidos, con más de 23.000 nuevos casos y aproximadamente 14.000 muertes predichas para el año 2001. Shridhar, V. *et al.*, *Cancer Res.* 61(15): 5895-904 (2001); Memarzadeh, S. y Berek, J. S., *J. Reprod. Med.* 46(7): 621-29 (2001). La Sociedad del Cáncer Americana (ACS) estima que habrá aproximadamente 25.580 nuevos casos de cáncer ovárico en 2004 y el cáncer ovárico provocará aproximadamente 16.090 muertes en los Estados Unidos. Sitio Web de la ACS: cancer.org de la web. Más mujeres mueren anualmente de cáncer ovárico que de todos los otros tumores malignos ginecológicos combinados. La incidencia del cáncer ovárico en los Estados Unidos se estima en 14,2 por cada 100.000 mujeres cada año y 9 mujeres de cada 100.000 mueren cada año de cáncer ovárico. En 2004, aproximadamente el 70-75 % de nuevos diagnósticos serán carcinoma de estadio III y IV con una supervivencia a 5 años predicha de ~15 %. Jemal *et al.*, Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2001, con un Artículo Especial con Respecto a la Supervivencia. *Cancer* 2004; 101: 3-27. La incidencia del cáncer ovárico es una preocupación importante en todo el mundo, con una estimación de 191.000 casos nuevos predichos anualmente. Runnebaum, I. B. y Stickeler, E., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127(2): 73-79 (2001). Desafortunadamente, las mujeres con cáncer ovárico son típicamente asintomáticas hasta que la enfermedad se ha metastatizado. Debido a que no está disponible una exploración eficaz para el cáncer ovárico, aproximadamente 70 % de las mujeres diagnosticadas tienen un estadio avanzado del cáncer con una tasa de supervivencia a cinco años de ~25-30 %. Memarzadeh, S. y Berek, J. S., mencionado anteriormente; Nunns, D. *et al.*, *Obstet. Gynecol. Surv.* 55(12): 746-51. Por el contrario, las mujeres diagnosticadas con cáncer ovárico de estadio temprano tienen tasas de supervivencia considerablemente mayores. Werness, B. A. y Eltabbakh, G. H., *Int'l. J. Gynecol. Pathol.* 20(1): 48-63 (2001). Aunque el entendimiento de la etiología del cáncer ovárico está incompleto, los resultados de investigación exhaustiva en esta área apuntan a una combinación de edad, genética, factores reproductivos, y dietéticos/ambientales. La edad es un factor de riesgo clave en el desarrollo de cáncer ovárico: aunque el riesgo de desarrollar cáncer ovárico antes de la edad de 30 es escaso, la incidencia del cáncer ovárico aumenta linealmente entre las edades 30 a 50, aumentando a una velocidad más lenta a continuación, siendo la mayor incidencia entre mujeres septuagenarias. Jeanne M. Schilder *et al.*, *Hereditary Ovarian Cancer: Clinical Syndromes and Management*, en Ovarian Cancer 182 (Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001).
- 45 Con respecto a factores genéticos, un historial familiar de cáncer ovárico es el factor de riesgo más significativo en el desarrollo de la enfermedad, dependiendo ese riesgo del número de miembros de la familia afectados, su grado de relación con la mujer, y qué parientes de primer grado particulares están afectados por la enfermedad. Misma referencia. Se han asociado mutaciones en varios genes con cáncer ovárico, incluyendo BRCA1 y BRCA2, ambos de los cuales desempeñan un papel clave en el desarrollo de cáncer de mama, así como hMSH2 y hMLH1, ambos de los cuales están asociados con cáncer de colon no poliposis hereditario. Katherine Y. Look, *Epidemiology, Etiology, and Screening of Ovarian Cancer*, en Ovarian Cancer 169, 171-73 (Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001). BRCA1, localizado en el cromosoma 17, y BRCA2, localizado en el cromosoma 13, son genes supresores de tumor implicados en la reparación de ADN, las mutaciones en estos genes están ligadas a aproximadamente el 10 % de los cánceres ováricos. Misma referencia en 171-72; Schilder *et al.*, mencionado anteriormente en 185-86. hMSH2 y hMLH1 están asociados con la reparación de desapareamiento de ADN, y se localiza en los cromosomas 2 y 3, respectivamente; se ha indicado que aproximadamente el 3 % de los carcinomas ováricos hereditarios se deben a mutaciones en estos genes. Look, mencionado anteriormente en 173; Schilder *et al.*, mencionado anteriormente en 184, 188-89.
- 60 También se han asociado factores reproductivos con un aumento o una reducción del riesgo de cáncer ovárico. La menopausia tardía, nuliparidad y edad temprana en la menarquia se han ligado todos con un riesgo elevado de cáncer ovárico. Schilder *et al.*, mencionado anteriormente en 182. Una teoría plantea la hipótesis de que estos factores aumentan el número de ciclos ovulatorios durante el transcurso de la vida de una mujer, lo que conduce a "ovulación incesante", que se cree que es la causa principal de mutaciones en el epitelio ovárico. Misma referencia;
- 65 Laura J. Havrilesky y Andrew Berchuck, *Molecular Alterations in Sporadic Ovarian Cancer*, en Ovarian Cancer

(Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001). Las mutaciones pueden explicarse por el hecho de que la ovulación da como resultado la destrucción y reparación de ese epitelio, necesitando división celular aumentada, aumentando de este modo la posibilidad de que se produzca una mutación no detectada. Misma referencia. Puede encontrarse apoyo para esta teoría en el hecho de que el embarazo, la lactancia y el uso de anticonceptivos orales, todos los cuales suprimen la ovulación, confieren un efecto protector con respecto al desarrollo de cáncer ovárico. Misma referencia.

Entre los factores dietéticos/ambientales, parece haber una asociación entre el alto consumo de grasa animal o carne roja y cáncer ovárico, mientras que el antioxidante Vitamina A, que evita la formación de radicales libres y también ayuda al mantenimiento de la diferenciación celular normal, puede ofrecer un efecto protector. Look, mencionado anteriormente en 169. Algunos informes han asociado también el amianto y el trisilicato de magnesio acuoso (talco), pudiendo estar presente este último en diafragmas y toallas sanitarias. Misma referencia en 169-70.

Los procedimientos de exploración actuales para cáncer ovárico, aunque tienen alguna utilidad, están bastante limitados con respecto a su capacidad de diagnóstico, un problema que es particularmente agudo en estadios tempranos de la progresión del cáncer cuando la enfermedad es típicamente asintomática pero se trata más fácilmente. Walter J. Burdette, Cancer: Etiology, Diagnosis, and Treatment 166 (1998); Memarzadeh y Berek, mencionado anteriormente; Runnebaum y Stickeler, mencionado anteriormente; Werness y Eltabbakh, mencionado anteriormente. Los ensayos de exploración usados habitualmente incluyen examen pélvico rectovaginal bianual, radioinmunoensayo para detectar el marcador de tumor en suero CA-125 y ecografía transvaginal. Burdette, mencionado anteriormente en 166. En la actualidad, CA-125 es el único marcador en suero clínicamente aprobado para su uso en cáncer ovárico. CA-125 se encuentra elevado en la mayoría de cánceres serosos, pero está elevado solamente en la mitad de las mujeres con enfermedad de estadio temprano. La aplicación clínica principal de CA125 está en el control del éxito del tratamiento o la detección de reaparición en mujeres que se someten a tratamiento para cáncer ovárico. Markman M. *The Oncologist*; 2: 6-9 (1997). El uso de CA125 como un marcador de exploración está limitado por que está frecuentemente elevado en mujeres con enfermedades benignas tales como endometriosis. Por lo tanto, existe la necesidad crítica de marcadores en suero nuevos que sean más sensibles y específicos para la detección de cáncer ovárico cuando se usen solos, o en combinación con CA125. Bast RC. *et al.*, Early Detection of Ovarian Cancer: Promise and Reality en Ovarian Cancer. Cancer Research and Treatment Vol 107 (Stack MS, Fishman, DA, eds., 2001).

El examen pélvico no ha conseguido producir números adecuados de diagnósticos tempranos, y los otros métodos no son suficientemente precisos. Misma referencia. Un estudio indicó que solamente al 15 % de los pacientes que padecían cáncer ovárico se les diagnosticó la enfermedad en el momento de su examen pélvico. Look, mencionado anteriormente en 174. Además, el ensayo de CA-125 es propenso a dar falsos positivos en mujeres premenopáusicas y se ha indicado que tiene bajo valor predictivo en mujeres postmenopáusicas. Misma referencia en 174-75. Aunque la ecografía transvaginal es ahora el procedimiento preferido para explorar con respecto a cáncer ovárico, es incapaz de distinguir de forma fiable entre tumores benignos y malignos, y tampoco puede localizar tumores malignos peritoneales primarios o cáncer ovárico si el tamaño del ovario es normal. Schilder *et al.*, mencionado anteriormente en 194-95. Aunque están disponibles ahora ensayos genéticos para mutaciones de los genes BRCA1, BRCA2, hMSH2 y hMLH1, estos ensayos pueden ser demasiado costosos para algunos pacientes y también pueden producir resultados de falso negativo o indeterminados. Schilder *et al.*, mencionado anteriormente en 191-94.

Adicionalmente, los intentos actuales se centran en la identificación de paneles de biomarcadores que pueden usarse en combinación. Bast RC Jr., *J Clin Oncol* 2003; 21: 200-205. En la actualidad, otros marcadores que se evalúan como marcadores de suero ováricos potenciales que pueden actuar como miembros de un panel multimarcador para mejorar la detección del cáncer ovárico son HE4; mesotelina; calicreína 5, 8, 10 y 11; y prostasina. Urban *et al.* *Ovarian Cancer screening Hematol Oncol Clin North Am.* Ago 2003; 17(4):9 89-1005; Hellstrom *et al.* The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma, *Cancer Res.* 1 jul 2003; 63(13): 3695-700; Ordonez, Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis, *Am J Surg Pathol.* Nov 2003; 27(11): 1418-28; Diamandis EP *et al.*, *Cancer Research* 2002; 62: 295-300; Yousef GM *et al.*, *Cancer Research* 2003; 63: 3958-3965; Kishi T *et al.*, *Cancer Research* 2003; 63: 2771-2774; Luo LY *et al.*, *Cancer Research* 2003; 63: 807-811; Mok SC *et al.*, *J Natl Cancer Inst* 2001; 93 (19): 1437-1439.

La estadificación del cáncer ovárico, que se consigue mediante exploración quirúrgica, es crucial para determinar el plan de tratamiento y control de la enfermedad. AJCC Cancer Staging Handbook 187 (Irvin D. Fleming *et al.* eds., 5ª ed. 1998); Burdette, mencionado anteriormente en 170; Memarzadeh y Berek, mencionado anteriormente; Shridhar *et al.*, mencionado anteriormente. Se realiza estadificación con referencia al sistema de clasificación desarrollado por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia. David H. Moore, Primary Surgical Management of Early Epithelial Ovarian Carcinoma, en Ovarian Cancer 203 (Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001); Fleming *et al.* eds., mencionado anteriormente en 188. El cáncer ovárico de estadio I se caracteriza por crecimiento tumoral que está limitado a los ovarios y está comprendido por tres subestadios. Misma referencia. En el subestadio IA, el crecimiento tumoral está limitado a un ovario, no hay tumor en la superficie externa del ovario, la cápsula ovárica está intacta, y no están presentes células malignas en líquido ascítico o lavados peritoneales. Misma

referencia. El subestadio IB es idéntico a AI, excepto que el crecimiento tumoral está limitado a ambos ovarios. Misma referencia. El subestadio IC se refiere a la presencia de crecimiento tumoral limitado a uno o ambos ovarios, y también incluye una o más de las siguientes características: ruptura de cápsula, crecimiento tumoral en la superficie de uno o ambos ovarios, y células malignas presentes en líquido ascítico o lavados peritoneales. Misma referencia.

El cáncer ovárico de estadio II se refiere a crecimiento tumoral que implica uno o ambos ovarios, junto con extensión pélvica. Misma referencia. El subestadio IIA implica extensión y/o implantes en el útero y/o las trompas de Falopio, sin células malignas en el líquido ascítico o lavados peritoneales, mientras que el subestadio IIB implica la extensión a otros órganos y tejidos pélvicos, de nuevo sin células malignas en el líquido ascítico o lavados peritoneales. Misma referencia. El subestadio IIC implica extensión pélvica como en IIA o IIB, pero con células malignas en el líquido ascítico o lavados peritoneales. Misma referencia.

El cáncer ovárico de estadio III implica crecimiento tumoral en uno o ambos ovarios, con metástasis peritoneal más allá de la pelvis confirmada por microscopio y/o metástasis en los ganglios linfáticos regionales. Misma referencia. El subestadio IIIA se caracteriza por metástasis peritoneal microscópica fuera de la pelvis, implicando el subestadio IIIB metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis de 2 cm o menos en su dimensión mayor. Misma referencia. El subestadio IIIC es idéntico a IIIB, excepto que la metástasis es mayor de 2 cm en su dimensión mayor y puede incluir metástasis de ganglios linfáticos regionales. Misma referencia. Finalmente, el estadio IV se refiere a la presencia de metástasis distante, excluyendo metástasis peritoneal. Misma referencia.

Aunque la estadificación quirúrgica es actualmente el punto de referencia para evaluar el control y tratamiento de cáncer ovárico, padece inconvenientes considerables, incluyendo la invasividad del procedimiento, el potencial de complicaciones, así como el potencial de imprecisión. Moore, mencionado anteriormente en 206-208, 213. A la vista de estas limitaciones, la atención ha pasado al desarrollo de metodologías de estadificación alternativas mediante el entendimiento de la expresión génica diferencial en diversos estadios de cáncer ovárico y obteniendo diversos biomarcadores para ayudar a evaluar mejor la progresión de la enfermedad. Vartiainen, J. *et al.*, *Int'l J. Cancer*, 95(5): 313-16 (2001); Shridhar *et al.* mencionado anteriormente; Baekelandt, M. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 18(22): 3775-81.

El tratamiento de cáncer ovárico típicamente implica un ataque múltiple, actuando la intervención quirúrgica como la base del tratamiento. Dermis S. Chi y William J. Hoskins, *Primary Surgical Management of Advanced Epithelial Ovarian Cancer*, en *Ovarian Cancer* 241 (Stephen C. Rubin y Gregory P. Sutton eds., 2ª ed. 2001). Por ejemplo, en el caso de cáncer ovárico epitelial, que representa ~90 % de los casos de cáncer ovárico, el tratamiento consiste típicamente en: (1) cirugía citoreductora, incluyendo histerectomía abdominal total, salpingo-ooforectomía bilateral, omentectomía y linfadenectomía, seguido de (2) quimioterapia adyuvante con paclitaxel y cisplatino o carboplatino. Eltabbakh, G. H. y Awtrey, C.S., *Expert Op. Pharmacother.* 2(10): 109-24. A pesar de una tasa de respuesta clínica del 80 % a la terapia adyuvante, la mayoría de los pacientes experimentan reaparición del tumor en un periodo de tres años después del tratamiento. Misma referencia. Ciertos pacientes pueden someterse a una segunda cirugía citoreductora y/o quimioterapia de segunda línea. Memarzadeh y Berek, mencionado anteriormente.

A partir de lo anterior, resulta evidente que los procedimientos usados para detectar, diagnosticar, controlar, estadificar, pronosticar y prevenir la reaparición del cáncer ovárico son críticamente importantes para el resultado del paciente. Además, los procedimientos actuales, aunque son útiles en cada uno de estos análisis, están limitados por su especificidad, sensibilidad, invasividad y/o su coste. Como tales, serían altamente deseables procedimientos altamente específicos y sensibles que actuarían detectando nuevos marcadores en células, tejidos o fluidos corporales, con mínima invasividad y a un coste razonable. Dado que la supervivencia es escasa y las opciones de tratamiento actuales no contribuyen mucho al resultado para el paciente (que es con frecuencia la muerte) existe una necesidad urgente de terapias específicas, eficaces para el cáncer ovárico.

En consecuencia, existe una gran necesidad de métodos más sensibles y precisos para predecir si una persona tiene probabilidad de desarrollar cáncer ovárico, para diagnosticar cáncer ovárico, para controlar la progresión de la enfermedad, para estadificar el cáncer ovárico, para determinar si el cáncer ovárico se ha metastatizado y para capturar imágenes del cáncer ovárico. También existe la necesidad de un mejor tratamiento de cáncer ovárico.

Cáncer de mama

El cáncer de mama, también denominado cáncer de tumor mamario, es el segundo cáncer más común entre mujeres, representando un tercio de los cánceres diagnosticados en los Estados Unidos. Una de cada nueve mujeres desarrollarán cáncer de mama durante su tiempo de vida y se diagnostican aproximadamente 192.000 nuevos casos de cáncer de mama anualmente con aproximadamente 42.000 muertes. Bevers, *Primary Prevention of Breast Cancer*, en *Breast Cancer*, 20-54 (Kelly K Hunt *et al.*, ed., 2001); Kochanek *et al.*, 49 *Nat'l Vital Statistics Reports* 1, 14 (2001). El cáncer de mama es extremadamente poco habitual en mujeres menores de 20 y es muy raro en mujeres menores de 30. La incidencia del cáncer de mama aumenta con la edad y se hace significativo a los 50 años de edad. Las mujeres blancas No Hispanas tienen la mayor tasa de incidencia para el cáncer de mama y

las mujeres coreanas tienen la menor. Se encuentra prevalencia aumentada de las mutaciones genéticas BRCA1 y BRCA2 que promueven los cánceres de mama y otros en Judíos Ashkenazi. Las mujeres Afroamericanas tienen la mayor tasa de mortalidad para cáncer de mama entre estos mismos grupos (31 por cada 100.000), mientras que las mujeres Chinas tienen la menor a 100 por cada 100.000. Aunque los hombres pueden tener cáncer de mama, esto es extremadamente poco habitual. En los Estados Unidos se estima que habrá 217.440 nuevos casos de cáncer de mama y 40.580 muertes debidas a cáncer de mama en 2004 (Sitio Web de la Sociedad del Cáncer Americana: cancer.org de la web). Con la excepción de los casos con factores genéticos asociados, las causas precisas del cáncer de mama se desconocen.

- 10 En el tratamiento del cáncer de mama, hay un énfasis considerable en la detección y evaluación del riesgo debido a que la estadificación temprana y precisa del cáncer de mama tiene una influencia significativa en la supervivencia. Por ejemplo, el cáncer de mama detectado en un estadio temprano (estadio T0, analizado posteriormente) y tiene una tasa de supervivencia a cinco años del 92 %. Por el contrario, si el cáncer no se detecta hasta un estadio tardío (es decir, estadio T4 (IV)), la tasa de supervivencia a cinco años se reduce al 13 %. AJCC Cancer Staging Handbook pp. 164-65 (Irvin D. Fleming *et al.* eds., 5ª ed. 1998). Algunas técnicas de detección, tales como mamografía y biopsia, implican una mayor incomodidad, gasto y/o radiación, y se recetan solamente a pacientes con un riesgo aumentado de cáncer de mama.

- Los métodos actuales para predecir o detectar el riesgo de cáncer de mama no son óptimos. Un método para predecir el riesgo relativo de cáncer de mama es examinando los factores de riesgo de un paciente y siguiendo regímenes de diagnóstico y tratamiento para pacientes de alto riesgo. El riesgo de un paciente de cáncer de mama se ha asociado positivamente con mayor edad, nuliparidad, historial familiar de cáncer de mama, historial personal de cáncer de mama, menarquia temprana, menopausia tardía, edad tardía del primer embarazo a término, enfermedad de mama proliferativa anterior, irradiación de la mama en una edad temprana y un historial personal de tumores malignos. Los factores de estilo de vida tales como consumo de grasas, consumo de alcohol, educación y estado socioeconómico también se han asociado con una incidencia aumentada de cáncer de mama aunque no se ha establecido una relación causa y efecto directa. Aunque estos factores de riesgo son estadísticamente significativos, su asociación débil con el cáncer de mama ha limitado su utilidad. La mayoría de las mujeres que desarrollan cáncer de mama no tienen ninguno de los factores de riesgo enumerados anteriormente, aparte del riesgo que acompaña a la mayor edad. Publicación de NIH N° 00-1556 (2000).

- Los métodos de exploración actuales para detectar cáncer, tales como autoexamen de mama, ultrasonidos y mamografía tienen desventajas que reducen su eficacia o evitan su adopción generalizada. Los autoexámenes de mama, aunque son útiles, son poco fiables para la detección de cáncer de mama en los estados iniciales en los que el tumor es pequeño y difícil de detectar por palpación. Las mediciones de ultrasonido requieren operadores cualificados con un mayor gasto. La mamografía, aunque es sensible, está sujeta a sobrediagnóstico en la detección de lesiones que tienen potencial maligno cuestionable. También existe el miedo de la radiación usada en la mamografía porque la radiación anterior del pecho es un factor asociado con un aumento de la incidencia de cáncer de mama.

- En este momento, no hay métodos adecuados para la prevención de cáncer de mama. Los métodos actuales de prevención de cáncer de mama implican mastectomía profiláctica (mastectomía realizada antes del diagnóstico de cáncer) y quimioprevención (quimioterapia antes del diagnóstico de cáncer) que son medidas drásticas que limitan su adopción incluso entre mujeres con riesgo aumentado de cáncer de mama. Bevers, mencionado anteriormente.

- Varios marcadores genéticos se han asociado con el cáncer de mama. Los ejemplos de estos marcadores incluyen antígeno carcinoembrionario (CEA) (Mughal *et al.*, *JAMA* 249: 1881 (1983)), MUC-1 (Frische y Liu, *J. Clin. Ligand* 72:320 (2000)), HER-2/neu (Haris *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncology* 15: A96 (1996)), uPA, PAI-1, LPA, LPC, RAK y BRCA (Esteve y Fritsche, *Serum and Tissue Markers for Breast Cancer*, en *Breast Cancer*, 286-308 (2001)). Estos marcadores tienen problemas con sensibilidad limitada, baja correlación y falsos negativos que limitan su uso para diagnóstico inicial. Por ejemplo, aunque la mutación del gen BRCA1 es útil como un indicador de un riesgo aumentado para cáncer de mama, tiene uso limitado en el diagnóstico de cáncer debido a que solamente el 6,2 % de los cánceres de mama son positivos para BRCA1. Malone *et al.*, *JAMA* 279: 922 (1998). Véase también, Mewman *et al.*, *JAMA* 279: 915 (1998) (correlación de solamente el 3,3 %).

- Hay cuatro clasificaciones primarias de cáncer de mama que varían según el sitio de origen y el alcance del desarrollo de la enfermedad.

- I. Carcinoma ductal *in situ* (DCIS): transformación maligna de células epiteliales ductales que permanecen en su posición normal. DCIS es una enfermedad puramente localizada, incapaz de metástasis.
- II. Carcinoma ductal invasivo (IDC): tumor maligno de las células epiteliales ductales que atraviesan la membrana basal y entran en el tejido de apoyo de la mama. El IDC puede con el tiempo propagarse a otra parte del cuerpo.
- III. Carcinoma lobular *in situ* (LCIS): tumor maligno que surge en un único lóbulo de la mama que no consigue extenderse a través de la pared lobular, permanece generalmente localizado.

IV. Carcinoma lobular de infiltración (ILC): tumor maligno que surge en un único lóbulo de la mama e invade directamente a través de la pared lobular tejidos adyacentes. En virtud de su invasión más allá de la pared lobular, el ILC puede penetrar en vasos linfáticos y sanguíneos y extenderse a sitios distantes.

- 5 Para el fin de determinar el pronóstico y el tratamiento, estos cuatro tipos de cáncer de mama se han estadificado de acuerdo con el tamaño del tumor primario (T), la implicación de los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M). Aunque DCIS por definición representa enfermedad de estadio I localizada, las otras formas de cáncer de mama pueden variar del estadio II al estadio IV. Existen factores de pronóstico adicionales que sirven además para guiar la intervención quirúrgica y médica. Los más habituales son el número total de ganglios linfáticos
10 implicados, estado del RE (receptor de estrógenos), estado del receptor de Her2/neu y grados histológicos.

- Los cánceres de mama se diagnostican en las categorías de estadio apropiado reconociendo que diferentes tratamientos son más eficaces para diferentes estadios del cáncer. El estadio TX indica que el tumor primario no puede evaluarse (es decir, el tumor se retiró o se retiró el tejido de mama). El estadio T0 se caracteriza por
15 anomalías tales como hiperplasia pero sin pruebas de tumor primario. El estadio Tis se caracteriza por carcinoma *in situ*, carcinoma intraductal, carcinoma lobular *in situ*, o enfermedad de Paget del pezón sin tumor. El estadio T1 (I) se caracteriza por tener un tumor de 2 cm o menos en la mayor dimensión. Dentro del estadio T1, T1c indica microinvasión de 0,1 cm o menos, T1a indica un tumor de entre 0,1 y 0,5 cm, T1b indica un tumor de entre 0,5 y 1 cm, y T1c indica tumores de entre 1 cm y 2 cm. El estadio T2 (II) se caracteriza por tumores de 2 cm a 5 cm en la
20 mayor dimensión. Los tumores mayores de 5 cm de tamaño se clasifican como estadio T3 (III). El estado T4 (IV) indica un tumor de cualquier tamaño con extensión a la pared torácica o piel. Dentro del estadio T4, T4a indica extensión del tumor a la pared torácica, T4b indica edema o úlcera de la piel de la mama o ganglios cutáneos satélites confinados a la misma mama, T4c indica una combinación de T4a y T4b, y T4d indica carcinoma inflamatorio. AJCC Cancer Staging Handbook pp. 159-70 (Irvin D. Fleming *et al.* eds., 5ª ed. 1998). Además de la
25 estadificación convencional, los tumores de mama pueden clasificarse de acuerdo con su estado de proteína receptora de estrógenos y receptora de progesterona. Fisher *et al.*, *Breast Cancer Research and Treatment* 7: 147 (1986). El estado patológico adicional, tal como estado HER2/neu también puede ser útil. Thor *et al.*, *J. Nat'l Cancer Inst.* 90: 1346 (1998); Paik *et al.*, *J. Nat'l. Cancer Inst.* 90: 1361 (1998); Hutchins *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncology* 17: A2 (1998); y Simpson *et al.*, *J. Clin. Oncology* 18: 2059 (2000).

- 30 Además de la estadificación del tumor primario, pueden estadificarse metástasis de cáncer de mama a ganglios linfáticos regionales. El estadio NX indica que los ganglios linfáticos no pueden evaluarse (por ejemplo, se han retirado previamente). El estadio N0 indica que no hay metástasis de ganglios linfáticos regionales. El estadio N1 indica metástasis a ganglios linfáticos axilares ipsilaterales móviles. El estadio N2 indica metástasis a ganglios
35 linfáticos axilares ipsilaterales fijados entre sí o con otras estructuras. El estadio N3 indica metástasis a ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales. Misma referencia.

- La determinación del estadio tiene valor pronóstico potencial y proporciona criterios para diseñar una terapia óptima. Simpson *et al.*, *J. Clin. Oncology* 18: 2059 (2000). En general, la estadificación patológica del cáncer de mama es
40 preferible a la estadificación clínica porque la primera proporciona un pronóstico más preciso. Sin embargo, la estadificación clínica se preferiría si fuera tan precisa como la estadificación patológica debido a que no depende de un procedimiento invasivo para obtener tejido para evaluación patológica. La estadificación del cáncer de mama podría mejorarse detectando nuevos marcadores en células, tejidos o fluidos corporales que podrían diferenciar entre diferentes estadios de invasión. El progreso en este campo permitirá un método más rápido y fiable para tratar
45 a pacientes con cáncer de mama.

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

- Hasta hace poco, el tratamiento habitual para todos los cánceres de mama era la mastectomía. Fonseca *et al.*, *Annals of Internal Medicine* 127: 1013 (1997). Sin embargo, datos recientes indican que procedimientos menos
55 radicales pueden ser igualmente eficaces, con respecto a supervivencia, para cáncer de mama en estadio temprano. Fisher *et al.*, *J. of Clinical Oncology* 16: 441 (1998). Las opciones de tratamiento para un paciente con cáncer de mama de estadio temprano (es decir, estadio Tis) puede ser cirugía de conservación de la mama seguido de radioterapia localizada en la mama. Como alternativa, puede emplearse mastectomía opcionalmente acoplada con radiación o reconstrucción de la mama. Estos métodos de tratamiento son igualmente eficaces en los estadios
60 tempranos del cáncer de mama.

- Los pacientes con cáncer de mama de estadio I y estadio II requieren cirugía con quimioterapia y/o terapia hormonal. La cirugía tiene un uso limitado en los pacientes de estadio III y estadio IV. Por lo tanto, estos pacientes son mejores candidatos para quimioterapia y radioterapia con cirugía limitada a biopsia para permitir la estadificación
65 inicial o posterior reestadificación debido a que el cáncer es pocas veces curativo en este estadio de la enfermedad.

AJCC Cancer Staging Handbook 84, 164-65 (Irvin D. Fleming *et al.* eds., 5ª ed.1998).

En un intento de proporcionar más opciones de tratamiento a los pacientes, se están realizando intentos de definir un estadio más temprano del cáncer de mama con baja reaparición que podría tratarse con lumpectomía sin tratamiento con radiación postoperatorio. Aunque se han realizado varios intentos de clasificar el cáncer de mama de estadio temprano, no se ha obtenido ninguna recomendación consenso sobre tratamiento de radiación postoperatorio a partir de estos estudios. Page *et al.*, Cancer 75: 1219 (1995); Fisher *et al.*, Cancer 75: 1223 (1995); Silverstein *et al.*, Cancer 77: 2267(1996).

10 Cáncer pancreático

El cáncer pancreático es el decimotercer cáncer más común y la octava causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo. Donghui Li, *Molecular Epidemiology, en Pancreatic Cancer* 3 (Douglas B. Evans *et al.* eds., 2002). En los Estados Unidos, el cáncer del páncreas es el cuarto cáncer más común tanto en hombres como en mujeres, representando el cinco por ciento de las muertes por cáncer y casi 30.000 muertes en total. Misma referencia. Las tasas de cáncer pancreático son mayores en hombres que en mujeres y mayores en Afroamericanos en comparación con Caucásicos. Misma referencia en 9. El predictor más significativo de cáncer pancreático es la edad del paciente; entre los Caucásicos, la incidencia relacionada con la edad del cáncer pancreático aumenta continuamente, incluso hasta los 85 y categorías mayores. Misma referencia en 3. Aproximadamente el 80 % de los casos suceden en el intervalo de edad de 60 a 80, experimentando las personas octogenarias un riesgo de adquirir la enfermedad 40 veces el de las personas entre 40 y 50 años. Misma referencia. Además, la Sociedad del Cáncer Americana estima que habrá aproximadamente 31.800 nuevos casos de cáncer pancreático en 2004 solamente en los Estados Unidos. El cáncer pancreático provocará aproximadamente 31.200 muertes en los Estados Unidos el mismo año. Sitios Web de la ACS: cáncer con la extensión.org de la web. A pesar de los intentos de los investigadores y médicos para idear tratamientos para el cáncer pancreático, este sigue siendo casi universalmente letal. James R. Howe, *Molecular Markers as a Tool for the Early Diagnosis of Pancreatic Cancer, en Pancreatic Cancer* 29 (Douglas B. Evans *et al.* eds., 2002).

Además de la edad, se han identificado varios factores de riesgo para el cáncer pancreático, incluyendo tabaquismo, dieta, ocupación, ciertas afecciones médicas, herencia y biología molecular. El tabaquismo es el factor de riesgo más importante para adquirir la enfermedad, habiéndose establecido la conexión entre el tabaquismo y el cáncer pancreático en numerosos estudios. Li, mencionado anteriormente en 3. El riesgo relativo suma al menos 1,5, aumentando con el nivel de tabaquismo hasta una relación de riesgo externo de 10 veces. Misma referencia. El siguiente factor más importante parecería ser la dieta, con riesgo aumentado asociado con el consumo de proteína y grasa animal, y riesgo reducido asociado con el consumo de frutas y verduras. Misma referencia en 3-4. Con respecto a ocupaciones particulares, se han asociado tasas excesivas de cáncer pancreático con trabajadores en química, exploración de carbón y gas, la industria metálica, el curtido del cuero, textiles, molienda de aluminio y transporte. Misma referencia en 4. También se han asociado varias afecciones médicas con una mayor incidencia de cáncer pancreático, incluyendo diabetes, pancreatitis crónica, gastrectomía y colecistectomía, aunque no se ha establecido una relación de causa y efecto entre estas afecciones y el cáncer pancreático. Misma referencia.

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

Desde el punto de vista de la biología molecular, la investigación ha revelado una asociación entre el cáncer pancreático y varias mutaciones genéticas, incluyendo la activación del protooncogén *K-ras* y la inactivación de los genes supresores de tumores *p53*, *p16* y *DPC4*. Marina E. Jean *et al.*, *The Molecular Biology of Pancreatic Cancer, en Pancreatic Cancer* 15 (Douglas B. Evans *et al.* eds., 2002).

En un estudio de adenocarcinomas pancreáticos, el 83 % poseía activación de *K-ras* junto con inactivación de *p16* y *p53*. Misma referencia. Se encuentran mutaciones de *K-ras* en el 80 al 95 % de adenocarcinomas pancreáticos, siendo los genes *p53*, *p16* y *DPC4* los genes supresores de tumor más frecuentemente suprimidos en cáncer del páncreas. Howe, mencionado anteriormente en 29. Se han descubierto delecciones homocigotas, hipermetilación y mutaciones del gen *p16* en 85 a 98 % de adenocarcinomas del páncreas. Misma referencia. Como se podría esperar por el papel de las alteraciones en los genes de *K-ras*, *p53*, *p16* y *DPC4*, la pérdida de regulación del ciclo celular parecería ser clave para la tumorigénesis en el páncreas, y podría explicar por qué este cáncer es tan agresivo. Jean, mencionado anteriormente en 15. La investigación también ha relevado una conexión entre este cáncer y la regulación anómala de ciertos factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento, así como una regulación positiva de metaloproteinasas de matriz y reguladores de la angiogénesis tumoral. Misma referencia. El

factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de hepatocitos y factor de crecimiento endotelial vascular pueden desempeñar diversos papeles en el cáncer pancreático, aunque dichos papeles no se han dilucidado. Misma referencia en 18-22.

5

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

Debido a la presente falta de métodos de exploración adecuados, los médicos están centrándose crecientemente en técnicas que emplean métodos de biología molecular como el medio más prometedor para diagnóstico temprano de la enfermedad. Howe, mencionado anteriormente en 30. En la actualidad, no hay ningún marcador de alta sensibilidad, alta especificidad, que permita la detección de cáncer pancreático en individuos asintomáticos, pero se están investigando varios marcadores biológicos. Misma referencia. Se están centrando en la actualidad esfuerzos considerables en K-ras, ideando los investigadores técnicas para explorar muestras de jugo pancreático, bilis, jugo duodenal o cepillados de ERCP para detectar mutaciones de K-ras. Misma referencia. Debido a que la recogida de estas muestras es invasiva y no es particularmente útil en la exploración de las personas que son asintomáticas, los investigadores también se han centrado en análisis de suero y heces con respecto a mutaciones de K-ras, siendo el primero el más prometedor, ya que el último está obstaculizado por la complejidad del material fuente. Misma referencia en 35-38, 42. Además, debido a que los niveles en suero de la proteína de factor de transcripción p53 pueden asemejarse a la progresión de cáncer, p53 se está estudiando de forma similar como un posible marcador tumoral. Misma referencia en 37; Jean *et al.*, mencionado anteriormente en 17.

35

Una vez que se ha diagnosticado el cáncer pancreático, se realizan escisiones de tratamiento en referencia al estadio de progresión del cáncer. Se emplean varias técnicas de captura de imágenes para estadificar el cáncer pancreático, siendo la tomografía computarizada (CT) el presente método preferente, Harmeet Kaur *et al.*, Pancreatic Cancer: Radiologic Staging, en Pancreatic Cancer 86 (Douglas B. Evans *et al.* eds., 2002); Ishiguchi, T. *et al*, Hepatogastroenterology 48(40): 923-27 (2001), a pesar del hecho de que frecuentemente infravalora el alcance del cáncer, ya que las metástasis de volumen pequeño están con frecuencia más allá de la resolución de CT, H J. Kim y K. C. Conlon, Laparoscopic Staging, en Pancreatic Cancer 15 (Douglas B. Evans *et al.* eds., 2002). La MRI puede en algún momento reemplazar a la CT a la vista de, entre otros, su capacidad para (1) contrastar entre diversos tejidos, (2) modificar las secuencias de pulso para mejorar la visualización de lesiones y minimizar los artefactos, (3) realizar captura de imágenes limitando al mismo tiempo la exposición de un paciente a radiación ionizante y (4) visualizar vasos sin usar reactivos de contraste yodados IV. Kaur *et al*, mencionado anteriormente en 87. En la actualidad, sin embargo, la MRI no ha demostrado una clara ventaja sobre la CT. Kim y Conlon, mencionado anteriormente en 116.

También se emplean en la actualidad una diversidad de técnicas ultrasónicas en la estadificación, incluyendo ultrasonido transabdominal (TUS), ultrasonido endoscópico (EUS) y ultrasonido intraoperatorio (IUS), siendo el EUS uno de los más prometedores. Kaur *et al.*, mencionado anteriormente en 86; Richard A. Erickson, Endoscopic Diagnosis and Staging: Endoscopic Ultrasound, Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography, en Pancreatic Cancer 97-106 (Douglas B. Evans *et al.* eds., 2002). Estas técnicas, sin embargo, se limitan cada una por una diversidad de factores: el TUS está obstaculizado por gas en el tracto gastrointestinal y grasa en el peritoneo, EUS requiere una experiencia considerable en ecografía y endoscopia y puede no estar ampliamente disponible, y el IUS solamente puede usarse de forma intraoperatoria. Kaur *et al*, mencionado anteriormente en 86.

Aunque está en sus estadios iniciales, la búsqueda de marcadores que ayuden a la estadificación de cáncer pancreático ha encontrado algunos posibles candidatos. Por ejemplo, la investigación ha revelado que dos genes supresores de metástasis *nm23-H1* y *KAI1*, se expresan diferencialmente dependiendo del estadio del cáncer pancreático, estando su expresión regulada positivamente en estadios tempranos y regulada negativamente en estadios posteriores de la enfermedad. Friess, H. *et al*, *J. Clin. Oncol* 19(9): 2422-32(2001). Los investigadores se han centrado también en la estadificación de ganglios linfáticos genéticos, particularmente buscando mutaciones en el protooncogén K-ras. Yamada, T. *et al*, *Int'l J. Oncol* 16(6): 1165-71 (2000). De forma similar, la investigación ha

65

- identificado que la presencia de secuencias de K-ras mutadas en plasma/suero está asociada con cáncer pancreático de estadio tardío, aunque la presencia de cáncer pancreático de estadio temprano puede detectarse también de esta manera. Sorenson, G. D., *Clin. Cancer Res.* 6(6): 2129-37 (2000). Una técnica de estadificación prometedora usando un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa multimarcador ha distinguido con éxito estadios de cáncer pancreático ensayando muestras sanguíneas y tisulares con respecto a expresión de ARNm de los siguientes marcadores tumorales: el gen de la gonadotropina coriónica humana β , el gen del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos *c-met*, y el gen de la β -1,4-N-acetil-galactosaminil-transferasa. Bilchik, A. *et al*, *Cancer* 88(5): 1037-44(2000).
- 10 Un sistema de clasificación usado habitualmente para estadificar el cáncer pancreático es el sistema TNM ideado por la Union Internationale Contre le Cancer. *AJCC Cancer Staging Handbook* 3 (Irvin D. Fleming *et al.* eds., 5ª ed. 1998). Este sistema se divide en varios estadios, cada uno de los cuales evalúa el grado de crecimiento del cáncer con respecto a tumor primario (T), ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis distante (M). Misma referencia.
- 15 El estadio 0 se caracteriza por carcinoma *in situ* (Tis), sin metástasis de ganglios linfáticos regionales (N0) y sin metástasis distante (M0). Misma referencia en 113. Los estadios I y II difieren del estadio 0 solamente con respecto a la categoría tumoral: el estadio I implica un tumor limitado solamente al páncreas que es (1) de 2 cm o menos en su dimensión mayor (T1) o (2) de más de 2 cm en su dimensión mayor (T2), mientras que el estadio II implica un tumor que se extiende directamente al duodeno, conducto biliar o tejidos peripancráticos (T3). Misma referencia. El
- 20 estadio III implica la categoría tumoral T1, T2 o T3; metástasis de ganglios linfáticos regionales (N1), que implica un único ganglio linfático (pN1a) o múltiples ganglios linfáticos (pN1b); y ninguna metástasis distante (M0). El estadio IVA se caracteriza por extensión tumoral directamente al estómago, bazo, colon o vasos grandes adyacentes (T4); cualquier categoría N; y ninguna metástasis distante (M0). Finalmente, el estadio IVB se caracteriza por cualquier categoría T, cualquier categoría N y metástasis distante (M1). Misma referencia.
- 25 Una vez que se ha estadificado el cáncer, el único tratamiento uniformemente eficaz para la enfermedad es la cirugía, y siendo solamente del diez al quince por ciento de los pacientes capaces de someterse a resección potencialmente curativa. Jean *et al*, mencionado anteriormente en 15; Fleming *et al.* eds., mencionado anteriormente en 111; William F. Regine, *Postoperative Adjuvant Therapy: Past, Present, and Future Trial Development*, en
- 30 *Pancreatic Cancer* 235 (Douglas B. Evans *et al.* eds., 2002). Además, la supervivencia a cinco años de los pacientes que se someten a resección está por debajo del veinte por ciento. Regine, mencionado anteriormente en 235. Aunque agentes quimioterapéuticos tales como gemcitabina y 5-fluorouracilo han mostrado algo de eficacia contra carcinomas pancreáticos, la realidad es que la quimioterapia ha mostrado poca influencia en la supervivencia de cáncer pancreático. Burdette, mencionado anteriormente en 101. La radioterapia ha proporcionado resultados
- 35 conflictivos con respecto a su eficacia, misma referencia, aunque la radiación en combinación con 5-fluorouracilo ha mostrado algo de promesa, Regine, mencionado anteriormente en 235.
- A la vista del fracaso de las técnicas convencionales en el tratamiento del cáncer pancreático, se han investigado varios enfoques nuevos que emplean las técnicas de biología molecular. Se ha realizado investigación considerable
- 40 en el área de la terapia génica, incluyendo tecnología antisentido, estrategias de activación de profármacos dirigidas por genes, estrategias de genes promotores y terapias virales oncolíticas. Eugene A. Choi y Francis R. Spitz, *Strategies for Gene Therapy*, en *Pancreatic Cancer* 331 (Douglas B. Evans *et al.* eds., 2002); Kasuya, H. *et al*, *Hepatology* 48(40): 957-61 (2001). Otros enfoques recientes se han centrado en la inhibición de las metaloproteinasas de matriz, enzimas que facilitan la metástasis e invasión de células tumorales a través de su
- 45 degradación de membranas basales, y su papel en la degradación del estroma peritumoral y angiogénesis. Alexander S. Rosemurgy, II y Mahmudul Haq, *Role of Matrix Metalloproteinase Inhibition in the Treatment of Pancreatic Cancer*, en *Pancreatic Cancer* 369 (Douglas B. Evans *et al.* eds., 2002).

Angiogénesis en cáncer

- 50 El crecimiento y la metástasis de tumores sólidos también dependen de la angiogénesis. Folkman, J., 1986, *Cancer Research*, 46, 467-473; Folkman, J., 1989, *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 4-6. Se ha mostrado, por ejemplo, que los tumores que se agrandan hasta más de 2 mm deben obtener su propio aporte sanguíneo y lo hacen induciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares. Una vez que estos nuevos vasos
- 55 sanguíneos se incluyen en el tumor, estos proporcionan un medio para que las células tumorales entren en la circulación y se metastaticen a sitios distantes tales como hígado, pulmón o hueso. Weidner, N., *et al*, 1991, *The New England Journal of Medicine*, 324(1), 1-8.
- La angiogénesis, definida como el crecimiento o brote de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes, es
- 60 un proceso complejo que sucede principalmente durante el desarrollo embrionario. El proceso es distinto de la vasculogénesis, por que las nuevas células endoteliales que revisten el vaso surgen de proliferación de células existentes, en lugar de diferenciarse de células madre. El proceso es invasivo y depende de la proteólisis de la matriz extracelular (ECM), migración de nuevas células endoteliales y síntesis de nuevos componentes de matriz. La angiogénesis se produce durante el desarrollo embrionario del sistema circulatorio; sin embargo, en humanos
- 65 adultos, la angiogénesis se produce solamente como respuesta a una condición patológica (excepto durante el ciclo

reproductivo en mujeres).

En condiciones fisiológicas normales en adultos, la angiogénesis tiene lugar solamente en situaciones muy restringidas tales como crecimiento del pelo y curación de heridas. Auerbach, W. y Auerbach, R., 1994, *Pharmacol Ther.* 63(3):265-311; Ribatti *et al.*, 1991, *Haematologica* 76(4): 311-20; Risau, 1997, *Nature* 386(6626): 671-4. La angiogénesis progresa por un estímulo que da como resultado la formación de una columna de migración de células endoteliales. La actividad proteolítica se centra en la punta de avance de este "brote vascular", que degrada la ECM lo suficiente para permitir que la columna de células se infiltre y migre. Detrás del frente de avance, las células endoteliales se diferencian y comienzan a adherirse entre sí, formando de este modo una nueva membrana basal.

Las células cesan después la proliferación y finalmente definen un lumen para la nueva arteriola o capilar.

Se ha reconocido gradualmente que la angiogénesis desregulada es responsable de una amplia serie de trastornos, incluyendo, pero sin limitación, cáncer, enfermedad cardiovascular, artritis reumatoide, psoriasis y retinopatía diabética. Folkman, 1995, *Nat Med* 1(1): 27-31; Isner, 1999, *Circulation* 99(13): 1653-5; Koch, 1998, *Arthritis Rheum* 41(6): 951-62; Walsh, 1999, *Rheumatology (Oxford)* 38(2): 103-12; Ware y Simons, 1997, *Nat Med* 3(2): 158-64.

Es de particular interés la observación de que se requiere angiogénesis por tumores sólidos para su crecimiento y metástasis. Folkman, 1986 mencionado anteriormente; Folkman 1990, *J Natl. Cancer Inst.* 82(1) 4-6; Folkman, 1992, *Semin Cancer Biol* 3(2): 65-71; Zetter, 1998, *Annu Rev Med* 49: 407-24. Un tumor comienza habitualmente como una única célula aberrante que puede proliferar solamente hasta un tamaño de algunos milímetros cúbicos debido a la distancia de los lechos capilares disponibles, y puede permanecer "durmiente" sin crecimiento adicional ni diseminación durante un período largo de tiempo. Algunas células tumorales cambian después al fenotipo angiogénico para activar células endoteliales, que proliferan y maduran en nuevos vasos sanguíneos capilares. Estos vasos sanguíneos de nueva formación no solamente permiten el crecimiento continuado del tumor primario, sino también la diseminación y recolonización de células tumorales metastásicas. Los mecanismos precisos que controlan el cambio angiogénico no se entienden bien, pero se cree que la neovascularización de la masa tumoral resulta del equilibrio neto de una multitud de estimuladores e inhibidores de angiogénesis Folkman, 1995, mencionado anteriormente.

Uno de los inhibidores de la angiogénesis más potentes es la endostatina identificada por O'Reilly y Folkman. O'Reilly *et al.*, 1997, *Cell* 88(2): 277-85; O'Reilly *et al.*, 1994, *Cell* 79(2): 315-28. Su descubrimiento se basó en el fenómeno de que ciertos tumores primarios pueden inhibir el crecimiento de metástasis distantes. O'Reilly y Folkman plantearon la hipótesis de que un tumor primario inicia la angiogénesis generando estimulantes angiogénicos en exceso de inhibidores. Sin embargo, los inhibidores angiogénicos, en virtud de su semivida más larga en circulación, alcanzan el sitio de un tumor secundario en exceso de los estimuladores. El resultado neto es el crecimiento de tumor primario e inhibición de tumor secundario. La endostatina es uno de una lista creciente de dichos inhibidores de angiogénesis producidos por tumores primarios. Es un fragmento proteolítico de una proteína mayor: la endostatina es un fragmento de 20 kDa del colágeno XVIII (aminoácido H1132-K1315 en el colágeno XVIII murino). Se ha mostrado que la endostatina inhibe específicamente la proliferación de células endoteliales *in vitro* y bloquea la angiogénesis *in vivo*. Lo que es más importante, la administración de endostatina a ratones portadores de tumor conduce a regresión tumoral significativa, y no se ha observado toxicidad o resistencia a fármacos incluso después de múltiples ciclos de tratamiento. Boehm *et al.*, 1997, *Nature* 390(6658): 404-407. El hecho de que la endostatina se dirige a células endoteliales genéticamente estables e inhibe una diversidad de tumores sólidos la hace un candidato muy atractivo para terapia antineoplásica. Fidler y Ellis, 1994, *Cell* 79(2): 185-8; Gastl *et al.*, 1997, *Oncology* 54(3): 177-84; Hinsbergh *et al.*, 1999, *Ann Oncol* 10 Supl 4: 60-3. Además, se ha mostrado que los inhibidores de angiogénesis son más eficaces cuando se combinan con radiación y agentes quimioterapéuticos. Klement, 2000, *J. Clin Invest*, 105(8) R15-24. Browder, 2000, *Cancer Res.* 6-(7) 1878-86, Arap *et al.*, 1998, *Science* 279(5349): 377-80; Mauceri *et al.*, 1998, *Nature* 394(6690): 287-91.

Como se ha analizado anteriormente, cada uno de los métodos para diagnóstico y estadificación de cáncer ovárico, pancreático, pulmonar o de mama está limitado por la tecnología empleada. En consecuencia, existe la necesidad de marcadores moleculares y celulares sensibles para la detección de cáncer ovárico, pancreático, pulmonar o de mama. Existe la necesidad de marcadores moleculares para la estadificación precisa, incluyendo estadificación clínica y patológica, de cánceres ováricos, pancreáticos, de pulmón o de mama para optimizar métodos de tratamiento. Además, existe la necesidad de marcadores moleculares y celulares sensibles para controlar el progreso de tratamientos de cáncer, incluyendo marcadores que pueden detectar la reaparición de cánceres ováricos, pancreáticos, de pulmón o de mama después de remisión.

La presente invención proporciona métodos alternativos para tratar cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o de mama que superan las limitaciones de métodos terapéuticos convencionales así como ofrecen ventajas adicionales que resultarán evidentes a partir de la descripción detallada posterior.

Enfermedad autoinmunitaria

La actividad celular del sistema inmunitario está controlada por una red compleja de interacciones de superficie celular y procesos de señalización asociados. Cuando se activa un receptor de superficie celular por su ligando se envía una señal a la célula y, dependiendo de la ruta de transducción de señal con la que interaccione, la señal puede ser inhibidora o activadora. Para muchos sistemas receptores la actividad celular está regulada por un equilibrio entre señales activadoras y señales inhibidoras. En algunas de estas se sabe que las señales positivas asociadas con la interacción de un receptor de superficie celular con su ligando están moduladas negativamente o inhibidas por señales negativas enviadas por la interacción de un receptor de superficie celular diferente con su ligando.

Los mecanismos bioquímicos de estas rutas de señalización positivas y negativas se han estudiado para varias interacciones de ligando y receptor de sistema inmunitario conocidas. Muchos receptores que median en la señalización positiva tienen colas citoplasmáticas que contienen sitios de fosforilación de tirosina fosfatasa conocidos como motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores (ITAM). Una ruta mecánica común para señalización positiva implica la activación de tirosina quinasas que fosforilan sitios en los dominios citoplasmáticos de los receptores y en otras moléculas de señalización. Una vez que los receptores se han fosforilado, se crean sitios de unión para moléculas de transducción de señales que inician las rutas de señalización y activan la célula. Las rutas inhibidoras implican receptores que tienen motivos inhibidores basados en tirosina inmunorreceptores (ITIM), que, como los ITAM, se fosforilan por tirosina quinasas. Los receptores que tienen estos motivos están implicados en la señalización inhibidora debido a que estos motivos proporcionan sitios de unión para tirosina fosfatasas que bloquean la señalización retirando la tirosina de receptores activados o moléculas de transducción de señal. Aunque muchos de los detalles de la activación y mecanismos inhibidores se desconocen, resulta evidente que el equilibrio funcional en el sistema inmunitario depende de señales activadoras e inhibidoras opuestas.

Un ejemplo de actividad del sistema inmunitario que está regulada por un equilibrio de señalización positiva y negativa es la proliferación de linfocitos B. El receptor de antígeno de linfocitos B es una inmunoglobulina de superficie de linfocitos B que, cuando se une a un antígeno, media en una señal positiva lo que conduce a proliferación de linfocitos B. Sin embargo, los linfocitos B también expresan Fc.gamma. RIIb1, un receptor de IgG de baja afinidad. Cuando un antígeno es parte de un complejo inmunitario con inmunoglobulina soluble, el complejo inmunitario puede unirse con linfocitos B interaccionando tanto con el receptor de antígeno de linfocitos B mediante el antígeno como con Fc.gamma. RIIb1 mediante la inmunoglobulina soluble. La interacción conjunta del Fc.gamma. RIIb1 con el complejo del receptor de linfocitos B modula negativamente la señal de activación y evita la proliferación de linfocitos B. Los receptores Fc.gamma. RIIb1 contienen motivos ITIM que se cree que suministran señales inhibidoras a linfocitos B mediante la interacción de los ITIM con tirosina fosfatasas tras la interacción conjunta con receptores de linfocitos B.

La actividad citolítica de linfocitos Citolíticos Naturales (NK) es otro ejemplo de actividad del sistema inmunitario que está regulada por un equilibrio entre señales positivas que inician la función celular y señales inhibidoras que evitan la actividad. Los receptores que activan la actividad citotóxica de NK no se entienden completamente. Sin embargo, si las células diana expresan antígenos del MHC de clase I de superficie celular para los que el linfocito NK tiene un receptor específico, la célula diana se protege de la destrucción por NK. Estos receptores específicos, conocidos como receptores inhibidores citolíticos (KIR) envían una señal negativa cuando interaccionan con su ligando de MHC, regulando negativamente la actividad citotóxica de los linfocitos NK.

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

Se sabe que un inmunorreceptor expresado por mastocitos de ratón, gp49B1, que también es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina, regula negativamente las señales de activación celular y contiene un par de motivos ITIM. Gp49B1 comparte un alto grado de homología con KIR humanos (Katz *et al.*, Cell Biology, 93: 10809-10814, 1996). Los linfocitos NK de ratón también expresan una familia de inmunorreceptores, la familia Ly49, que contienen el motivo ITIM y actúan de una manera similar a los KIR humanos. Sin embargo, los inmunorreceptores de

Ly49 no tienen homología estructural con KIR humanos y contienen un dominio de lectinas de tipo C extracelular, haciéndolos un miembro de la superfamilia de moléculas de lectinas (véase Lanier *et al.*, Immunology Today 17: 86-91, 1996).

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

- Por ejemplo el acoplamiento de un ligando tal como Ovr110 que interacciona con un receptor de superficie celular que tiene motivos ITIM con un anticuerpo antagonista o receptor soluble puede usarse para activar la función
- 15 inmunitaria específica en patologías asociadas con función inmunitaria suprimida. Por otro lado, el uso de un anticuerpo antagonista específico para Ovr110 o una forma soluble del receptor de Ovr110 puede usarse para bloquear la interacción de Ovr110 con el receptor de superficie celular para reducir la función inmunitaria específica en patologías asociadas con función inmunitaria aumentada. Por el contrario, ya que los receptores que carecen del
- 20 motivo ITIM envías señales activadoras una vez acoplados como se ha descrito anteriormente, el efecto de los anticuerpos y receptores solubles es el opuesto al que se acaba de describir.

- En otro ejemplo, se cree que Ovr110 se une con un receptor de superficie celular (que puede tener o no motivos ITIM/ITAM) y se ha mostrado que tiene efectos inhibidores en el sistema inmunitario mediante macrófagos tales
- 25 como linfocitos T, linfocitos B u otros tipos celulares. Un anticuerpo Ovr110 podría bloquear este efecto inhibidor y potenciar una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria potenciada podría ser beneficiosa en tratamientos de enfermedad antitumorales, antiinfecciosos, antiinflamatorios.

- Por el contrario, un mAb agonista de Ovr110 tiene el efecto opuesto para inducir la inhibición de respuesta
- 30 inmunitaria. Esto es beneficioso en escenarios tales como trasplante de tejidos en el que se desea respuesta inmunitaria del hospedador suprimida contra el tejido ajeno.

- En un ejemplo adicional, basándose en la comparación con otros miembros de la familia B7 Ovr110 se une con un receptor activador en células del sistema inmunitario u otras células (como células tumorales en sí mismas) y envía
- 35 una señal positiva. En este caso un mAb antagonista de Ovr110 bloquea la activación del receptor y un mAb agonista de Ovr110 activa la activación del receptor.

- Como se ha analizado anteriormente, los métodos para diagnosticar y estadificar enfermedades autoinmunitarias están limitados por la tecnología empleada. En consecuencia, existe la necesidad de marcadores moleculares y
- 40 celulares sensibles para la detección de enfermedades autoinmunitarias. Existe la necesidad de marcadores moleculares para la estadificación precisa, incluyendo estadificación clínica y patológica, de enfermedades autoinmunitarias para optimizar los métodos de tratamiento. Además, existe la necesidad de marcadores moleculares y celulares sensibles para controlar el progreso de tratamientos de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo marcadores que pueden detectar la reaparición de enfermedades autoinmunitarias después de remisión.

- 45 Se describen en el presente documento métodos alternativos para tratar enfermedades autoinmunitarias que superan las limitaciones de los métodos terapéuticos convencionales además de ofrecer ventajas adicionales que resultarán evidentes a partir de la descripción detallada posterior.

- 50 La presente invención también proporciona anticuerpos para su uso en el tratamiento de cáncer, bien afectando a la célula tumoral directamente o bien modulando la respuesta inmunitaria al cáncer.

Sumario de la invención

- 55 La invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende:

- (a) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7;
- (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12 y una
- 60 (c) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17;
- (c) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27; o
- (d) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 42 y una
- 65 (d) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 47.

La invención también se refiere a anticuerpos conjugados. Pueden conjugarse con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico. El agente citotóxico puede seleccionarse del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radiactivos y enzimas nucleolíticas y toxinas. Los ejemplos de toxinas incluyen, pero sin limitación, maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina o caliqueamicina.

5

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

10 El anticuerpo puede producirse en bacterias o en células de mamífero (o por otros organismos no limitados a plantas, levadura). Preferentemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer ovárico, pancreático, endometrial, de pulmón y de mama. Se describe además un método para producir los anticuerpos que comprende cultivar una célula apropiada y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

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

La invención también se refiere a un anticuerpo para su uso en la destrucción de una célula cancerosa que expresa Ovr110, que comprende poner en contacto la célula cancerosa con los anticuerpos de la presente invención, destruyendo de este modo la célula cancerosa. La célula cancerosa puede seleccionarse del grupo que consiste en célula de cáncer de cabeza y cuello, ovárico, pancreático, de pulmón y de mama.

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

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

30 La invención también se refiere a un anticuerpo para su uso en la modulación de la señalización de un receptor de Ovr110 de célula inmunitaria con señalización negativa que comprende unión de Ovr110 con anticuerpo anti Ovr110 reduciendo de este modo una función inmunitaria suprimida.

Adicionalmente, la invención se refiere a un anticuerpo para su uso en la modulación de una respuesta inmunitaria que comprenden unir Ovr110 con un anticuerpo anti Ovr110 reduciendo de este modo una función inmunitaria suprimida. La modulación puede ser una respuesta inmunitaria aumentada o una reducción de la supresión de una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede ser contra una célula cancerosa. La célula cancerosa puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de cabeza y cuello, ovárico, pancreático, de pulmón, endometrial y de mama. La respuesta inmunitaria puede ser números aumentados de linfocitos que rodean a un tumor, infiltración aumentada de linfocitos en un tumor, o activación aumentada de linfocitos incluyendo linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK y otros tipos celulares inmunitarios.

Se describe además un método para aumentar la activación de linfocitos que comprende unir Ovr110 con un anticuerpo anti Ovr110 reduciendo de este modo la supresión de la activación de linfocitos. El linfocito puede ser un linfocito T.

La invención también puede referirse a un anticuerpo para su uso en la destrucción o inhibición de células tumorales uniéndolo un anticuerpo con la célula tumoral.

55 Breve descripción de las Figuras

FIGURA 1: inmunofluorescencia que demuestra unión de anticuerpo anti Ovr110 con la superficie de células tumorales humanas vivas.

FIGURA 2: inmunofluorescencia que demuestra la internalización de anticuerpo anti Ovr110 por células tumorales humanas vivas.

Descripción detallada de la invenciónDefiniciones y técnicas generales

- 5 “Ovr110” humano como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de 282 aminoácidos que se expresa en la superficie celular como una glucoproteína, cuyas secuencias de nucleótidos y aminoácidos son como se desvela, por ejemplo, en el documento WO 00/12758, el gen específico de cáncer (CSG) Ovr110; documento WO 99/63088, la proteína unida a Membrana PRO1291; documento WO00/36107, antígeno de carcinoma ovárico Humano; documento WO 02/02624-A2, proteína de tipo B7 humana (B7-L). Ya que la proteína Ovr110 contiene un
- 10 péptido señal de secreción, los aminoácidos 30-282 se localizan en la superficie celular de la proteína madura nativa. Ovr110 como se usa en el presente documento incluye variantes alélicas y mutantes de sustitución conservativa de la proteína que tienen actividad biológica de Ovr110.

- Ovr110 se conoce en la bibliografía como B7x, B7H4, B7S1, B7-H4 o B7h.5. La base de datos RefSeq en el NCBI
- 15 indica la referencia NM_024626 como “dominio de conjunto V de *Homo sapiens* que contiene inhibidor de la activación de linfocitos T 1 (VTCN1), ARNm”. Se proporciona el siguiente sumario para este nucleótido y la proteína codificada NP_078902.1:

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

Se enumera a continuación una lista de referencias que analizan Ovr110

Chen Y, Yang C, Xie Z, Zou L, Ruan Z, Zhang X, Tang Y, Fei L, Jia Z, Wu Y. Expression of the novel co-stimulatory molecule B7-H4 by renal tubular epithelial cells. Kidney Int. 18 oct 2006 [Epub]
Ou D, Wang X, Metzger DL, Ao Z, Pozzilli P, James RF, Chen L, Warnock GL Suppression of human T-cell responses to beta-cells by activation of B7-H4 pathway. Cell Transplant. 2006; 15(5): 399-410.
Suh WK, Wang S, Duncan GS, Miyazaki Y, Cates E, Walker T; Gajewska BU, Deenick E, Dawicki W, Okada, H, Wakeham A, Itie A. Watts TH, Ohashi PS, Jordana M, Yoshida H, Mak TW. Generation and characterization of B7-H4/B7S1/B7x-deficient mice. Mol Cell Biol. Sep 2006; 26(17): 6403-11.
Krambeck AE, Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Park ES, Kunti SM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival. Proc Natl Acad Sci USA. 5 jul 2006 5; 103(27):10391-6. Epub 23 jun 2006.
Kryczek I, Wel S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H. Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. J Immunol. 1 jul 2006; 177(1): 40-4.
Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK, Wang X. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer. Ago 2006; 53(2): 143-51. Epub 19 jun 2006.
Bignotti E, Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, Romani C, Rossi E, Falchetti M, Odicino FE, Pecorelli S, Santin AD. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: Identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. Gynecol Oncol. Nov 2006; 103(2): 405-16. Epub 24 may 2006.
Mao YX, Chen YJ, Ge Y, Ma HB, Yu JF, Wu HY, Hu YM, Wang Q, Shi Q, Zhang XG; Recombinant human B7-H4 expressed in Escherichia coli inhibits T lymphocyte proliferation and IL-2 secretion in vitro. Acta Pharmacol Sin. Jun 2006; 27 (6): 741-6;
Kryczek Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, Brumlik M, Cheng P, Curiel T, Myers L, Lackner A, Alvarez X, Ochoa A, Chen L, Zou W. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. J Exp Med. 17 abr 2006; 203(4): 871-81. Epub 10 abr 2006.
Simon I, Zhuo S, Corral L, Diamandis EP, Sarno MJ, Wolfert RL, Kim NW. B7-h4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. Cancer Res. 1 feb 2006; 66(3): 1570-5.
Tringler B, Liu W, Corral L, Torkko KC, Enomoto T, Davidson S, Lucia MS, Heinz DE, Papkoff J, Shroyer KR. B7-H4 overexpression in ovarian tumors. Gynecol Oncol. Ene 2006; 100(1): 44-52.

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

Un grupo de tres publicaciones independientes identificaron Ovr110 en ratón y ser humano como un nuevo miembro de la familia B7 de linfocitos T de moléculas coestimuladoras, una clase importante de moléculas que regulan muy estrechamente la activación/inhibición de la función de linfocitos T. Prasad *et al*, B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation, *Immunity* 18: 863-73 (2003); Sica *et al.*, B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity, *Immunity* 18: 849-61 (2003); y Zang *et al*, B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation, *Proc. Natl Acad. Sci USA* 100: 10388-92 (2003). La secuencia de aminoácidos predicha del gen de ratón para B7S1 (Prasad 2003) fue altamente homóloga con la molécula Ovr110 previamente identificada por los inventores, y la secuencia predicha de las moléculas de B7-H4/B7x humanas (Sica 2003; Zang 2003) fueron idénticas a Ovr110. Publicaciones adicionales han demostrado la sobreexpresión de B7-H4 en diversos cánceres incluyendo cáncer de mama (Tringer 2005; Salceda 2005), cáncer ovárico (Salceda 2005; Tringer 2006, Simon 2006, Kryczek *J Exp Med* 2006; Bignotti 2006), cáncer de pulmón (Sun 2006) y carcinoma de células renales (Krambeck 2006; Chen 2006). Estudios funcionales han dilucidado adicionalmente la asociación de B7-H4 con poblaciones de macrófagos supresores (Kryczek *J Exp Med* 2006), vascularización tumoral (Krambeck 2006) e inmunorregulación incluyendo producción del factor de interleucina y la activación de linfocitos T, proliferación e infiltración tumoral (Mao 2006; Kryczek *J Immunol* 2006).

Se han generado previamente y se han caracterizado anticuerpos anti Ovr110 que se describen en los documentos WO 2004/101756, WO 2006/053110 y WO2006/074418. El análisis inmunofluorescente directo por citometría de

flujo confirmó adicionalmente la unión de los anticuerpos monoclonales de Ovr110 de los inventores con poblaciones de linfocitos T activados y células tumorales, como se ha descrito por los autores anteriormente. Estos anticuerpos de la presente invención, los descritos previamente y en el presente documento, se unen específicamente con Ovr110 y han demostrado características que los hacen candidatos terapéuticos ideales para modular las funciones de B7-H4 incluyendo regulación de linfocitos T (y otras células inmunitarias) tal como activación, proliferación e infiltración tumoral, evasión de la vigilancia inmunitaria (supresión de la respuesta inmunitaria), producción del factor de interleucina (IL-2, IL-6, IL-10, IL-x), vascularización tumoral y activación de células beta. Además, los anticuerpos de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos para los pacientes que padecen cánceres de mama, ovárico, endometrial, de pulmón, pancreático, renal y de cabeza y cuello. Los anticuerpos pueden tener efecto terapéutico destruyendo células cancerosas que expresan Ovr110, inhibiendo el crecimiento de tumores que expresan Ovr110, reduciendo tumores que expresan Ovr110, extendiendo el tiempo de supervivencia de individuos con tumores que expresan Ovr110, reduciendo las metástasis de tumores que expresan Ovr110, induciendo respuesta inmunitaria contra tumores que expresan Ovr110, reduciendo la inhibición de respuesta inmunitaria contra tumores que expresan Ovr110 o reduciendo la angiogénesis o vascularización de tumores que expresan Ovr110.

El término "anticuerpo" (Ab) como se usa en el presente documento incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que muestren la actividad biológica deseada. La expresión "inmunoglobulina" (Ig) se usa indistintamente con "anticuerpo" en el presente documento.

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

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

El VL está alineado con el VH y el CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1).

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

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

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensivamente en su secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo del tramo de 1-10 aminoácidos de los dominios variables. En su lugar, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones marco conservadas (FR) de 15-30 aminoácidos separados por

regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que son de 9-12 aminoácidos de longitud cada una. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan principalmente una configuración en lámina P, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura en lámina P. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

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

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminación por otros anticuerpos. No debe interpretarse que el modificador "monoclonal" requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse por la metodología de hibridoma descrita en primer lugar en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse usando métodos de ADN recombinantes en células bacterianas, animales eucariotas o vegetales (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véase Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo Mono del Viejo Mundo, Simio, etc.), y secuencias de región constante humanas.

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

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo íntacto, preferentemente la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo íntacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase patente de Estados Unidos 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar rápidamente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (VH), y el primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab con enlaces disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y aún son capaces de entrecruzarse con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab porque tienen pocos restos adicionales en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 incluyendo una o más cisteínas de la

región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación del presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de 8 fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

5

El fragmento Fc comprende las partes carboxilo terminal de ambas cadenas H mantenidas unidas por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, siendo dicha región también la parte reconocida por receptores de Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

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

"Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv

20 comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, mencionado posteriormente.

- 25 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase párrafo precedente) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios VH y VL de modo que se consigue emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos
- 30 biospecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "de cruce" en los que los dominios VH y VL de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

- Un polipéptido de "secuencia nativa" es uno que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido (por
- 35 ejemplo, anticuerpo) derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. Por lo tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido humano, polipéptido murino o polipéptido de cualquier otra especie de mamífero de origen natural.

- 40 La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a un polipéptido que tiene secuencias de aminoácidos que difieren en algún grado de un polipéptido de secuencia nativa. Habitualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos de Ovr110 poseerán al menos aproximadamente 70 % de homología con la secuencia nativa de Ovr110, preferentemente, al menos aproximadamente 80 %, más preferentemente al menos
- 45 aproximadamente 85 %, aún más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de homología, y más preferentemente al menos 95 %. Las variantes de secuencia de aminoácidos pueden poseer sustituciones, deleciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. Los ejemplos de variantes de Ovr110 que surgen de corte y empalme de transcrito alternativo incluyen Ovr110vl en el documento WO 2004/053079 y dv-B7-H4 (Referencia de Genbank DQ103575 y Sun *et al.*, mencionado anteriormente). Los anticuerpos de la presente invención tienen actividad terapéutica como se ha
- 50 analizado anteriormente para estas variantes de Ovr110.

- La expresión "fragmento o análogo funcional" de un anticuerpo es un compuesto que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento o análogo funcional de un anticuerpo anti IgE es uno que puede unirse con una inmunoglobulina de IgE de tal manera que evite o reduzca
- 55 sustancialmente la capacidad de dicha molécula para tener la capacidad de unirse con el receptor de alta afinidad, FcεRI.

- "Homología" se define como el porcentaje de restos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de
- 60 homología. Se conocen bien en la técnica métodos y programas informáticos para el alineamiento. La similitud de secuencia puede medirse por cualquier algoritmo de análisis de secuencia común, tal como GAP o BESTFIT y otro alineamiento de Smith-Waterman variante. Véase, T. F. Smith y M. S. Waterman, *J. Mol. Biol.* 147: 195-197 (1981) y W. R. Pearson, *Genomics* 11: 635-650 (1991).

- 65 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que

contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan con restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596(1992).

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

Si un anticuerpo anti Ovr110 se internaliza tras la unión de Ovr110 en una célula de mamífero, puede determinarse por diversos ensayos incluyendo los descritos en los ejemplos experimentales posteriores. Por ejemplo, para ensayar la internalización *in vivo*, el anticuerpo de ensayo se marca e introduce en un animal que se sabe que tiene Ovr110 expresado en la superficie de ciertas células. El anticuerpo puede radiomarcarse o marcarse con partículas fluorescentes o de oro, por ejemplo. Los animales adecuados para este ensayo incluyen un mamífero tal como un ratón desnudo o un ratón SCID que contiene un trasplante o xenoinjerto de tumor que expresa Ovr110 humano, o un ratón en el que se han introducido células transfectadas con Ovr110 humano, o un ratón transgénico que expresa el transgén de Ovr110 humano. Los controles apropiados incluyen animales que no recibieron el anticuerpo de ensayo o que recibieron un anticuerpo no relacionado, y los animales que recibieron un anticuerpo para otro antígeno en las células de interés, conociéndose que dicho anticuerpo se internaliza tras su unión con el antígeno. El anticuerpo puede administrarse al animal, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o inyección intraperitoneal. A intervalos temporales adecuados, pueden prepararse secciones del tumor o tejido del animal usando métodos conocidos o como se describen en los ejemplos experimentales posteriores, y analizarse por microscopía óptica o microscopía electrónica, con respecto a unión o internalización así como la localización del anticuerpo internalizado en la célula. También pueden usarse métodos de captura de imágenes de animales vivos tales como PET para demostrar la localización de los anticuerpos en el tumor. Para internalización *in vitro*, las células pueden incubarse en placas de cultivo tisular en presencia o ausencia de los anticuerpos relevantes añadidos al medio de cultivo y procesarse para análisis microscópico en puntos temporales deseados. La presencia de un anticuerpo internalizado, marcado en las células puede visualizarse directamente por microscopía o por autorradiografía si se usa un anticuerpo radiomarcado. Como alternativa, en un ensayo bioquímico cuantitativo, una población de células que comprenden células que expresan Ovr110 se ponen en contacto *in vitro* o *in vivo* con un anticuerpo de ensayo radiomarcado y las células (si se pone en contacto *in vivo*, las células se aíslan después tras una cantidad de tiempo adecuada) se tratan con una proteasa o se someten a un lavado ácido para retirar el anticuerpo no internalizado en la superficie celular. Las células se muelen y se mide la cantidad de recuentos radiactivos, resistentes a proteasa, por minuto (cpm) asociados con cada lote de células pasando el homogeneizado a través de un contador de centelleo. Basándose en la actividad específica conocida del anticuerpo radiomarcado, el número de moléculas de anticuerpo internalizadas por célula puede deducirse a partir de los recuentos de centelleo de las células molidas. Las células se “ponen en contacto” con un anticuerpo *in vitro* preferentemente en forma de solución tal como añadiendo las células al medio de cultivo celular en la placa de cultivo o matraz y mezclando el anticuerpo bien con el medio para asegurar una exposición uniforme de las células al anticuerpo. En lugar de añadir al medio de cultivo, las células pueden ponerse en contacto con el anticuerpo de ensayo en una solución isotónica tal como PBS en un tubo de ensayo durante el periodo de tiempo deseado. *In vivo*, las células se ponen en contacto con anticuerpo por cualquier método adecuado para administrar el anticuerpo de ensayo tal como los métodos de administración descritos posteriormente cuando se administran a un paciente.

Cuanto más rápida sea la velocidad de internalización del anticuerpo tras la unión con la célula que expresa Ovr110 *in vivo*, más rápido podrá conseguirse el efecto inhibitor de crecimiento o de destrucción deseado en la célula que expresa Ovr110 diana, por ejemplo, por un inmunoconjugado citotóxico. Preferentemente, la cinética de internalización de los anticuerpos anti Ovr110 es tal que favorece la destrucción rápida de la célula diana que

expresa Ovr110. Por lo tanto, es deseable que el anticuerpo anti Ovr110 muestre una velocidad de internalización rápida preferentemente, en un periodo de 24 horas desde la administración del anticuerpo *in vivo*, más preferentemente en un periodo de aproximadamente 12 horas, incluso más preferentemente en un periodo de aproximadamente 30 minutos a 1 hora y, más preferentemente, en un periodo de aproximadamente 30 minutos. La presente invención proporciona anticuerpos que se internalizan tan rápido como aproximadamente 15 minutos desde el momento de introducir el anticuerpo anti Ovr110 *in vivo* o *in vitro*. El anticuerpo se internalizará preferentemente en la célula en un periodo de algunas horas tras la unión con Ovr110 en la superficie celular, preferentemente en un periodo de 1 hora, aún más preferentemente en un periodo de 15-30 minutos.

- 10 Para determinar si un anticuerpo de ensayo puede competir con respecto a la unión con el mismo epítipo que el epítipo con el que se unen los anticuerpos anti Ovr110 de la presente invención incluyendo los anticuerpos producidos por los hibridomas depositados en la ATCC, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado, por ejemplo, un ensayo de ELISA competitivo. En un ensayo de ELISA competitivo ejemplar, los pocillos recubiertos con Ovr110 de una placa de microtitulación, o perlas de sepharose recubiertas con Ovr110, se preincuban con o sin anticuerpo competidor candidato y después se añade un anticuerpo anti Ovr110 marcado con biotina de la invención. La cantidad de anticuerpo anti Ovr110 marcado unido con el antígeno Ovr110 en los pocillos o en las perlas se mide usando conjugado de avidina-peroxidasa y sustrato apropiado.

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

- Un anticuerpo que tiene una "característica biológica" de un anticuerpo designado, tal como cualquiera de los anticuerpos monoclonales Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A 99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1, Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2, Ovr110.J3, Ovr110.Q1, Ovr110.Q3, Ovr110.Q4, Ovr110.Q5, Ovr110.Q6, Ovr110.Q7, Ovr110.Q8, Ovr110.Q9, Ovr110.Q10, Ovr110.Q11, Ovr110.Q12, Ovr110.Q13, Ovr110.Q14, Ovr110.Q15, Ovr110.Q16, Ovr110.Q17, Ovr110.Q18, Ovr110.Q19, Ovr110.Q20, Ovr110.Q21, Ovr110.Q23, Ovr110.Q24, Ovr110.Q25, Ovr110.Q26 y Ovr110.Q27 es uno que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distingue de otros anticuerpos que se unen con el mismo antígeno, Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A 99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1, Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2, Ovr110.J3, Ovr110.Q1, Ovr110.Q3, Ovr110.Q4, Ovr110.Q5, Ovr110.Q6, Ovr110.Q7, Ovr110.Q8, Ovr110.Q9, Ovr110.Q10, Ovr110.Q11, Ovr110.Q12, Ovr110.Q13, Ovr110.Q14, Ovr110.Q15, Ovr110.Q16, Ovr110.Q17, Ovr110.Q18, Ovr110.Q19, Ovr110.Q20, Ovr110.Q21, Ovr110.Q23, Ovr110.Q24, Ovr110.Q25, Ovr110.Q26 y Ovr110.Q27 se unirá con el mismo epítipo que con el que se une Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado como Ovr110 A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1, Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2, Ovr110.J3, Ovr110.Q1, Ovr110.Q3, Ovr110.Q4, Ovr110.Q5, Ovr110.Q6, Ovr110.Q7, Ovr110.Q8, Ovr110.Q9, Ovr110.Q10, Ovr110.Q11, Ovr110.Q12, Ovr110.Q13, Ovr110.Q14, Ovr110.Q15, Ovr110.Q16, Ovr110.Q17, Ovr110.Q18, Ovr110.Q19, Ovr110.Q20, Ovr110.Q21, Ovr110.Q23, Ovr110.Q24, Ovr110.Q25, Ovr110.Q26 y Ovr110.Q27 (por ejemplo que compite por la unión o bloquea la unión del anticuerpo monoclonal Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado

como Ovr110.A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1., Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2, Ovr110.J3, Ovr110.Q1, Ovr110.Q3, Ovr110.Q4, Ovr110.Q5, Ovr110.Q6, Ovr110.Q7, Ovr110.Q8, Ovr110.Q9, Ovr110.Q10, Ovr110.Q11, Ovr110.Q12, Ovr110.Q13, Ovr110.Q14, Ovr110.Q15, Ovr110.Q16, Ovr110.Q17, Ovr110.Q18, Ovr110.Q19, Ovr110.Q20, Ovr110.Q21, Ovr110.Q23, Ovr110.Q24, Ovr110.Q25, Ovr110.Q26 y Ovr110.Q27 para Ovr110, será capaz de dirigirse a una célula tumoral que expresa Ovr110 *in vivo* y puede internalizarse tras la unión con Ovr110 en una célula de mamífero *in vivo*. De forma similar, un anticuerpo con la característica biológica del anticuerpo Ovr110.A7.1, Ovr110.A10.1, Ovr110.A13.1, Ovr110.A31.1, Ovr110.A57.1, Ovr110.A72.1 (previamente identificado como Ovr110.A22.1), Ovr110.A77.1, Ovr110.A87.1, Ovr110.A89, Ovr110.A99.1, Ovr110.A102.1, Ovr110.A107, Ovr110.C1, Ovr110.C2, Ovr110.C3.2, Ovr110.C4, Ovr110.C5.1, Ovr110.C5.3, Ovr110.C6.3, Ovr110.C7.1, Ovr110.C8, Ovr110.C9.1, Ovr110.C10.1, Ovr110.C11.1, Ovr110.C12.1, Ovr110.C13, Ovr110.C14, Ovr110.C15, Ovr110.C16.1, Ovr110.C17.1, Ovr110.D9.1, Ovr110.I1, Ovr110.I2, Ovr110.I3, Ovr110.I4, Ovr110.I6, Ovr110.I7, Ovr110.I8, Ovr110.I9, Ovr110.I10, Ovr110.I11, Ovr110.I13, Ovr110.I14, Ovr110.I5, Ovr110.I16, Ovr110.I17, Ovr110.I18, Ovr110.I20, Ovr110.I21, Ovr110.I22, Ovr110.J1, Ovr110.J2, Ovr110.J3, Ovr110.Q1, Ovr110.Q3, Ovr110.Q4, Ovr110.Q5, Ovr110.Q6, Ovr110.Q7, Ovr110.Q8, Ovr110.Q9, Ovr110.Q10, Ovr110.Q11, Ovr110.Q12, Ovr110.Q13, Ovr110.Q14, Ovr110.Q15, Ovr110.Q16, Ovr110.Q17, Ovr110.Q18, Ovr110.Q19, Ovr110.Q20, Ovr110.Q21, Ovr110.Q23, Ovr110.Q24, Ovr110.Q25, Ovr110.Q26 y Ovr110.Q27 que tendrá las mismas propiedades de unión a epítipo, dirección, internalización, inhibición del crecimiento tumoral y citotóxicas del anticuerpo.

El término anticuerpo “antagonista” se usa en su sentido más amplio e incluye un anticuerpo que bloquea parcial o completamente, inhibe o neutraliza una actividad biológica de una proteína Ovr110 nativa desvelada en el presente documento. Los métodos para identificar antagonistas de un polipéptido Ovr110 pueden comprender poner en contacto un polipéptido Ovr110 o una célula que expresa Ovr110 en la superficie celular, con un anticuerpo antagonista candidato y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido Ovr110. Un anticuerpo agonista incluye anticuerpos que potencian, activan o facilitan la función de Ovr110.

Un “anticuerpo que inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan Ovr110” o un anticuerpo “inhibidor del crecimiento” es uno que se une con y da como resultado inhibición del crecimiento medible de células cancerosas que expresan o sobreexpresan Ovr110, *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos anti Ovr110 inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células tumorales que expresan Ovr110, por ejemplo células de cáncer ovárico, pancreático, endometrial, de cabeza y cuello, de riñón, de pulmón o de mama) en más del 20 %, preferentemente de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 %, y aún más preferentemente, en más del 50 % (por ejemplo de aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 %) en comparación con el control apropiado, siendo el control típicamente células tumorales no tratadas con el anticuerpo que se ensaya. La inhibición del crecimiento puede medirse a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,12 a 30 pg/ml o de aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, en el que la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de células tumorales *in vivo* puede determinarse de diversas maneras tal como se describe en la sección de Ejemplos Experimentales posterior. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti Ovr110 a aproximadamente 1 pg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da como resultado la reducción del tamaño tumoral o proliferación de células tumorales en un periodo de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en un periodo de aproximadamente 5 a 30 días.

Un anticuerpo que “induce apoptosis” es uno que induce la muerte celular programada como se determina por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos). La célula es habitualmente una que sobreexpresa Ovr110. Preferentemente la célula es una célula tumoral, por ejemplo una célula ovárica, pancreática, de pulmón o de mama. Están disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la traslocación de fosfatidil serina (PS) puede medirse por unión con anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante escalonado de ADN; y condensación nuclear/de cromatina junto con fragmentación de ADN puede evaluarse mediante cualquier aumento en células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo que induce la apoptosis es uno que da como resultado aproximadamente de 2 a 50 veces, preferentemente aproximadamente de 5 a 50 veces, y más preferentemente aproximadamente de 10 a 50 veces, la inducción de unión a anexina en relación con células no tratadas en un ensayo de unión a anexina.

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

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

“Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretado unido en receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo linfocitos Citolíticos Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente con una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” las células citotóxicas y se requieren de forma absoluta para dicha destrucción. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

“Receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase revisión M. en Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifican en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia, de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo de sangre.

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

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracterizan típicamente por crecimiento celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B, cáncer cerebral, así como de cabeza y cuello, y metástasis asociadas.

Una “célula que expresa Ovr110” es una célula que expresa Ovr110 endógeno o transfectado en la superficie celular. Un “cáncer que expresa Ovr110” es un cáncer que comprende células que tienen proteína Ovr110 presente en la superficie celular. Un “cáncer que expresa Ovr110” produce suficientes niveles de Ovr110 en la superficie de células del mismo, de modo que un anticuerpo anti Ovr110 puede unirse con las mismas y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Un cáncer que “sobreexpresa” Ovr110 es uno que tiene niveles significativamente mayores de Ovr110 en la superficie celular del mismo, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Dicha sobreexpresión puede estar provocada por amplificación génica o por transcripción o traducción aumentada. La sobreexpresión de Ovr110 puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando niveles aumentados de la proteína Ovr110 presente en la superficie de una

- célula (por ejemplo mediante un ensayo inmunohistoquímico; análisis de FACS). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico o ARNm que codifica Ovr110 en la célula, por ejemplo mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia de Southern, transferencia de Northern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Se puede estudiar también la sobreexpresión de Ovr110 midiendo el antígeno en un fluido biológico tal como suero, por ejemplo, usando ensayos basados en anticuerpos (véase también, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.933.294 expedida el 12 de junio de 1990; documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; Patente de Estados Unidos 5.401.638 expedida el 28 de marzo de 1995; y Sias *et al.* J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, están disponibles diversos ensayos *in vivo* para el experto en la materia. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo un isótopo radiactivo, y puede evaluarse la unión de anticuerpo con células en el paciente, por ejemplo mediante exploración externa con respecto a radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo. Un cáncer que expresa Ovr110 incluye cáncer ovárico, pancreático, endometrial, de cabeza y cuello, de riñón, de pulmón o de mama. Los fluidos corporales incluyen todos los fluidos internos, secretados, expulsados y derivados del cuerpo tales como sangre, plasma, suero, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido ascítico, fluido de lavado peritoneal, fluido linfático, bilis, semen, pus, líquido Amniótico, humor Acuoso, Cerumen, Quilo, Quimo, fluido Intersticial, Menstruación, Leche, Moco, Fluido pleural, sudor, Lubricación vaginal, vómito, líquido cefalorraquídeo y líquido sinovial.
- Un “mamífero” para fines de tratar un cáncer o aliviar los síntomas del cáncer, se refiere a cualquier mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.
- “Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o el trastorno patológico diana. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como los propensos a tener el trastorno o en los que el trastorno se debe prevenir. Un sujeto o mamífero se “trata” con éxito para un cáncer que expresa Ovr110 si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti Ovr110 de acuerdo con los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible en o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción del número de células cancerosas o ausencia de las células cancerosas; reducción del tamaño tumoral; inhibición (es decir, ralentización en algún grado y preferentemente detención) de la infiltración de células cancerosas a órganos periféricos incluyendo la propagación del cáncer a tejido blando y hueso; inhibición (es decir, ralentización en algún grado y preferentemente detención) de metástasis tumoral o angiogénesis; inhibición, en algún grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio en algún grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en asuntos de calidad de vida. En la medida en que el anticuerpo anti Ovr110 puede prevenir el crecimiento de y/o destruir células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico. El paciente también puede notar la reducción de estas señales o síntomas.
- Los parámetros anteriores para evaluar el tratamiento exitoso y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos rutinarios con los que está familiarizado un médico. Para terapia de cáncer, puede medirse la eficacia, por ejemplo, evaluando el tiempo de progresión a enfermedad (TTP) y/o determinando la velocidad de respuesta (RR).
- La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo o un fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno de un sujeto o mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en algún grado, el crecimiento tumoral y/o aliviar el algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición precedente de “tratar”. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico.
- La administración “crónica” se refiere a la administración del agente o los agentes en un modo continuo a diferencia de un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo prolongado.
- La administración “intermitente” es un tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.
- La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.
- Los “vehículos” como se usa en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las

dosificaciones y concentraciones empleadas.

Con frecuencia el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se entiende que el término incluye isótopos radiactivos (por ejemplo At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomocina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, por ejemplo, gelonina, ricina, saporina y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente. Otros agentes citotóxicos se describen posteriormente. Un agente tumoricida provoca la destrucción de células tumorales.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa Ovr110, bien *in vitro* o bien *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que expresan Ovr110 en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden a la detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo Europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El Paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en las células.

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

La expresión “marcado en el epítipo” usada en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido anti Ovr110 fusionado con un “polipéptido marcador”. El polipéptido anti Ovr110 puede ser un anticuerpo anti Ovr110, o fragmento antigénico del mismo. El polipéptido marcador tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el que puede prepararse un anticuerpo, pero es suficientemente corto de modo que no interfiere con la actividad de la proteína unida con la que se fusiona. El polipéptido marcador también es preferentemente bastante único de modo que el anticuerpo contra él sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos seis restos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

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

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

Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una ARN, ADN, o un polímero mixto, que está sustancialmente separada de otras secuencias de ADN del genoma así como proteínas o complejos tales como ribosomas y polimerasas, que acompañan de forma natural a una secuencia nativa. La

expresión abarca una molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su ambiente de origen natural, e incluye aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Una molécula de ácido nucleico sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula de ácido nucleico.

5

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

10

La célula que produce un anticuerpo anti Ovr110 de la invención incluirá la célula de hibridoma parental, por ejemplo, los hibridomas que se depositan en la ATCC, así como células hospedadoras bacterianas, de levadura y eucariotas en las que se ha introducido ácido nucleico que codifica los anticuerpos. Se desvelan posteriormente células hospedadoras adecuadas.

15

La interferencia de ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico posttranscripcional específico de secuencia en animales mediado por ARN de interferencia corto (ARNip) (Fire *et al.*, 1998, Nature, 391, 806). El proceso correspondiente en plantas se denomina habitualmente silenciamiento génico posttranscripcional o silenciamiento de ARN y se denomina además disipación en hongos. Se cree que el proceso de silenciamiento génico posttranscripcional es un mecanismo de defensa celular conservado evolutivamente para prevenir la expresión de genes ajenos que se comparte habitualmente por flora y filos diversos (Fire *et al.*, 1999, Trends Genet, 15, 358). Dicha protección de la expresión de genes ajenos puede haber evolucionado en respuesta a la producción de ARN bicatenarios (ARNbc) derivado de infección viral o la integración aleatoria de elementos transposónicos en un genoma hospedador mediante una respuesta celular que destruye específicamente ARN monocatenario homólogo o ARN genómico viral. La presencia de ARNbc en células desencadena la respuesta de ARNi mediante un mecanismo que aún no se ha caracterizado completamente. Este mecanismo parece ser diferente de la respuesta de interferón que resulta de la activación mediada por ARNbc de proteína quinasa PKR y 2',5'-oligoadenilato sintetasa que da como resultado escisión no específica de ARNm por ribonucleasa L.

20

25

30

La presencia de ARNbc largos en células estimula la actividad de una enzima ribonucleasa III denominada Dicer. Dicer está implicada en el procesamiento del ARNbc en trozos cortos de ARNbc conocidos como ARN de interferencia cortos (ARNip) (Berstein *et al.*, 2001, Nature, 409, 363). Los ARN de interferencia cortos derivados de actividad de Dicer son típicamente de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud y comprenden dobles cadenas de aproximadamente 19 pares de bases. Dicer también se ha implicado en la escisión de ARN temporales pequeños (ARNtp) de 21 y 22 nucleótidos de ARN precursor de estructura conservada que están implicados en el control de la traducción (Hutvagner *et al.*, 2001, Science, 293, 834). La respuesta de ARNi también presenta un complejo de endonucleasa que contiene un ARNip, denominado habitualmente un complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que media en la escisión de ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido de la doble cadena de ARNip. La escisión del ARN diana tiene lugar en el medio de la región complementaria de la cadena antisentido de la doble cadena de ARNip (Elbashir *et al.*, 2001, Genes Dev., 15,188).

35

40

Se ha estudiado la ARNi mediada por ARN de interferencia corto en una diversidad de sistemas. Fire *et al.*, 1998, Nature, 391, 806, fueron los primeros en observar ARNi en *C. elegans*. Wianny y Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70, describen ARNi mediada por ARNbc en embriones de ratón. Hammond *et al.*, 2000, Nature, 404, 293, describen ARNi en células de *Drosophila* transfectadas con ARNbc. Elbashir *et al.*, 2001, Nature, 411, 494, describen ARNi inducida por introducción de dobles cadenas de ARN de 21 nucleótidos sintéticos en células de mamífero cultivadas incluyendo células de riñón embrionario humano y HeLa. Trabajos recientes en lisados embrionarios de *Drosophila* (Elbashir *et al.*, 2001, EMBO J., 20,6877) han revelado ciertos requisitos para la longitud, estructura, composición química y secuencia de ARNip que son esenciales para mediar en la actividad de ARNi eficaz. Estos estudios han mostrado que dobles cadenas de ARNip de 21 nucleótidos son más activas cuando contienen salientes 3' de dos nucleótidos. Además, la sustitución completa de una o ambas cadenas de ARNip con nucleótidos 2'-desoxi (2'-H) o 2'-O-metilo anula la actividad de ARNi, mientras que se ha mostrado que la sustitución de los nucleótidos salientes de ARNip 3' terminales con desoxinucleótidos (2'-H) se tolera. También se ha mostrado que secuencias de un único desapareamiento en el centro de la doble cadena de ARNip anulan la actividad de ARNi. Además, estos estudios también indican que la posición del sitio de escisión en el ARN diana se define por el extremo 5' de la secuencia guía de ARNip en lugar del extremo 3' (Elbashir *et al.*, 2001, EMBO J., 20, 6877). Otros estudios han indicado que se requiere un 5'-fosfato en la cadena complementaria de diana de una doble cadena de ARNip para la actividad de ARNip y que se utiliza ATP para mantener el resto de 5'-fosfato en el ARNip (Nykanen *et al.*, 2001, Cell, 107, 309).

45

50

55

60

Los estudios han mostrado que reemplazar segmentos salientes 3' de una doble cadena de ARNip de 21 unidades que tienen salientes 3' de dos nucleótidos con desoxirribonucleótidos no tiene un efecto adverso en la actividad de ARNi. Se ha indicado que reemplazar hasta 4 nucleótidos en cada extremo del ARNip con desoxirribonucleótidos

65

- está bien tolerado mientras que la sustitución completa con desoxirribonucleótidos no da como resultado actividad de ARNi (Elbashir *et al.*, 2001, EMBO J., 20, 6877). Además, Elbashir *et al.*, mencionado anteriormente, también indican que la sustitución de ARNip con nucleótidos 2'-O-metilo anula completamente la actividad ARNi. Li *et al.*, Publicación de PCT Internacional N° WO 00/44914, y Beach *et al.*, Publicación de PCT Internacional N° WO 01/68836 sugieren ambos que el ARNip "puede incluir modificaciones de la cadena principal de azúcar-fosfato o el nucleósido para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre", sin embargo ninguna de las solicitudes enseña en qué grado estas modificaciones se toleran en moléculas de ARNip ni proporcionan ningún ejemplo de dicho ARNip modificado. Kreutzer y Limmer, Solicitud de Patente Canadiense N° 2.359.180, también describen ciertas modificaciones químicas para su uso en construcciones de ARNbc para contrarrestar la activación de proteína quinasa dependiente de ARN bicatenario PKR, específicamente nucleótidos 2'-amino o 2'-O-metilo, y nucleótidos que contienen un enlace de 2'-O o 4'-C metileno. Sin embargo, Kreutzer y Limmer de forma similar no consiguen mostrar en qué grado estas modificaciones se toleran en moléculas de ARNip ni proporcionan ningún ejemplo de dicho ARNip modificado.
- 15 Parrish *et al.*, 2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087, ensayaron ciertas modificaciones químicas que se dirigían al gen unc-22 en *C. elegans* usando transcritos de ARNip largos (>25 nt). Los autores describen la introducción de restos de tiofosfato en estos transcritos de ARNip incorporando análogos de nucleótidos trifosfato con ARN polimerasa T7 y T3 y observaron que "ARN con dos bases modificadas (con fosforotioato) también tenían reducciones sustanciales en su eficacia como desencadenantes de ARNi (datos no mostrados); la modificación (con fosforotioato) de más de dos restos desestabilizó en gran medida los ARN *in vitro* y no fueron capaces de ensayar las actividades de interferencia". Misma referencia en 1081. Los autores también ensayaron ciertas modificaciones en la posición 2' del azúcar de nucleótidos en los transcritos de ARNip largos y observaron que la sustitución de ribonucleótidos con desoxinucleótidos "produjo una reducción sustancial de la actividad de interferencia", especialmente en el caso de sustituciones de Uridina a Timidina y/o Citidina a desoxi Citidina. Misma referencia. Además, los autores ensayaron ciertas modificaciones de bases, incluyendo sustituir uracilo con 4-tiouracilo, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 3-(aminoalil)uracilo, y guanosina con inosina en cadenas con sentido y antisentido del ARNip, y descubrieron que mientras que 4-tiouracilo y 5-bromouracilo estaban todos bien tolerados, la inosina "produjo una reducción sustancial en la actividad de interferencia" cuando se incorporó en una de las cadenas. La incorporación de 5-yodouracilo y 3-(aminoalil)uracilo en la cadena antisentido dio como resultado reducción sustancial de la actividad de ARNi también.
- 30 Beach *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 01/68836, describe métodos específicos para atenuar la expresión génica usando ARNbc derivado de forma endógena. Tuschl *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 01/75164, describe un sistema de ARNi *in vitro* de *Drosophila* y el uso de moléculas de ARNi específicas para ciertas aplicaciones genómicas funcionales y terapéuticas; aunque Tuschl, 2001, Chem. Biochem., 2, 239-245, duda de que pueda usarse ARNi para curar enfermedades genéticas o infección viral debido "al peligro de activar una respuesta de interferón". Li *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 00/44914, describe el uso de ARNbc específicos para su uso en la atenuación de la expresión de ciertos genes diana. Zernicka-Goetz *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 01/36646, describe ciertos métodos para inhibir la expresión de genes particulares en células de mamífero usando ciertas moléculas de ARNbc. Fire *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 99/32619, describe métodos particulares para introducir ciertas moléculas de ARNbc en células para su uso en la inhibición de la expresión génica. Plaetinck *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 00/01846, describe ciertos métodos para identificar genes específicos responsables de conferir un fenotipo particular en una célula usando moléculas de ARNbc específicas. Mello *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 01/29058, describe la identificación de genes específicos implicados en ARNi mediada por ARNbc. Deschamps Depaillette *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 99/07409, describe composiciones específicas que consisten en moléculas de ARNbc particulares combinadas con ciertos agentes antivirales. Driscoll *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 01/49844, describe construcciones de ADN específicas para su uso para facilitar el silenciamiento génico en organismos diana. Parrish *et al.*, 2000, Molecular Cell, 6, 1977-1087, describe construcciones de ARNip modificadas químicamente específicas que se dirigen al gen unc-22 de *C. elegans*. Tuschl *et al.*, Publicación Internacional de PCT N° WO 02/44321, describe ciertas construcciones de ARNip sintéticas.

Composiciones y métodos de la invención

- La invención proporciona anticuerpos anti Ovr110. Preferentemente, los anticuerpos anti Ovr110 se internalizan tras su unión con Ovr110 de superficie celular en una célula de mamífero. Como alternativa, los anticuerpos anti Ovr110 inhiben la función de Ovr110 uniéndose con proteína Ovr110 nativa en células. Los anticuerpos anti Ovr110 también pueden destruir o conducir a la destrucción de células tumorales que portan Ovr110.

- No resultó evidente que Ovr110 fuera competente para internalización. Además la capacidad de un anticuerpo para internalizarse depende de varios factores incluyendo la afinidad, avidéz e isotipo del anticuerpo, y el epítipo con el que se une. Se conoce bien que no todos los pares de anticuerpo-antígeno muestran la capacidad de internalizarse. Los inventores han demostrado en el presente documento que el Ovr110 de superficie celular es competente para internalización tras su unión con los anticuerpos anti Ovr110 de la invención. Adicionalmente, se ha demostrado que los anticuerpos anti Ovr110 de la presente invención pueden dirigirse específicamente a células tumorales que expresan Ovr110 *in vitro* e *in vivo* e inhiben o destruyen estas células. Estas propiedades de dirección tumoral *in*

- vivo, internalización e inhibición del crecimiento de los anticuerpos anti Ovr110 hace a estos anticuerpos muy adecuados para usos terapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de diversos cánceres incluyendo cáncer ovárico, pancreático, endometrial, de cabeza y cuello, de riñón, de pulmón o de mama. Se prefiere la internalización del anticuerpo anti Ovr110, por ejemplo, si el anticuerpo o conjugado de anticuerpo tiene un sitio intracelular de acción y si el agente citotóxico conjugado con el anticuerpo no cruza fácilmente la membrana plasmática (por ejemplo, la toxina caliqueamicina). La internalización no es necesaria si los anticuerpos o el agente conjugado con los anticuerpos no tienen sitios intracelulares de acción, por ejemplo, si el anticuerpo puede destruir la célula tumoral mediante ADCC o algún otro mecanismo.
- 10 Los anticuerpos anti Ovr110 de la invención también tienen diversas aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti Ovr110 de la presente invención pueden ser útiles para el diagnóstico y estadificación de cánceres que expresan Ovr110 (por ejemplo, en captura de imágenes radiológicas u otros métodos de captura de imágenes). Pueden usarse solos o en combinación con otros marcadores de cáncer ovárico, incluyendo, pero sin limitación CA125, HE4 y mesotelina. Los anticuerpos son también útiles para purificación o inmunoprecipitación de Ovr110 de células, para detección y cuantificación de Ovr110 *in vitro*, por ejemplo en ELISA o una transferencia de Western o por IHC, para destruir y eliminar células que expresan Ovr110 de una población de células mixtas como una etapa en la purificación de otras células. Los anticuerpos anti Ovr110 de internalización de la invención pueden estar en las diferentes formas abarcadas por la definición de "anticuerpo" en el presente documento. Por lo tanto, los anticuerpos incluyen anticuerpo de longitud completa o intacto, fragmentos de anticuerpo, anticuerpo de secuencia nativa o variantes de aminoácidos, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados, y fragmentos polipeptídica de los mismos. En anticuerpos de fusión, una secuencia de anticuerpo se fusiona con una secuencia polipeptídica heteróloga. Los anticuerpos pueden modificarse en la región Fc para proporcionar funciones efectoras deseadas. Como se analiza en más detalle en las secciones posteriores, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido a la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o reclutando el complemento en citotoxicidad dependiente de complemento, o algún otro mecanismo. Como alternativa, cuando sea deseable eliminar o reducir la función efectora, para minimizar los efectos secundarios o complicaciones terapéuticas, pueden usarse ciertas otras regiones Fc.
- Se describen anticuerpos que compiten por la unión, o se unen sustancialmente, con el mismo epítipo con el que se unen los anticuerpos de la invención. También se describen anticuerpos que tienen las características biológicas de los anticuerpos anti Ovr110 presentes de la invención, por ejemplo, un anticuerpo anti Ovr110 que tiene las características biológicas de un anticuerpo monoclonal que comprende SEC ID N°: 1- 50, específicamente incluyendo la dirección tumoral *in vivo*, internalización y cualquier característica de inhibición de la proliferación celular o citotóxica. Se describen específicamente anticuerpos anti Ovr110 que se unen con un epítipo presente en los aminoácidos 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-210, 210-220, 220-230, 230-240, 240-250, 250-260, 260-270, 270-282 o 21-35, 31-45, 41-55, 51-65, 61-75, 71-85, 81-95, 91-105, 101-115, 111-125, 121-135, 131-145, 141-155, 151-165, 161-175, 171-185, 181-195, 191-205, 201-215, 211-225, 221-235, 231-245, 241-255, 251-258 de Ovr110 humano.
- Se describen en detalle posteriormente métodos para producir los anteriores anticuerpos.
- Los presentes anticuerpos anti Ovr110 son útiles para tratar un cáncer que expresa Ovr110 o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Dicho cáncer incluye cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o de mama, cáncer del tracto urinario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer pancreático y cáncer ovárico, más específicamente, adenocarcinoma de próstata, carcinomas de células renales, adenocarcinomas colorrectales, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas de células escamosas de pulmón y mesotelioma pleural. Los cánceres abarcan cánceres metastásicos de cualquiera de los anteriores, por ejemplo, metástasis de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o de mama. El anticuerpo es capaz de unirse con al menos una parte de las células cancerosas que expresan Ovr110 en el mamífero y preferentemente es uno que no induce o que minimiza la respuesta de HAMA. Preferentemente, el anticuerpo es eficaz para destruir o matar células tumorales que expresan Ovr110 o inhibir el crecimiento de dichas células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, tras la unión con Ovr110 en la célula. Dicho anticuerpo incluye un anticuerpo anti Ovr110 desnudo (no conjugado con ningún agente). Los anticuerpos anti Ovr110 desnudos demuestran eficacia en combinación con otro agente terapéutico tal como un taxano u otro fármaco usado para tratar cáncer. Los anticuerpos anti Ovr110 desnudos que tienen propiedades de inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* incluyen los anticuerpos descritos en los ejemplos experimentales posteriores. En algunos casos la función de los anticuerpos desnudos pueden ser solamente evidentes en combinación con otro agente quimioterapéutico tal como un taxano u otro fármaco usado para tratar el cáncer.
- Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades de inhibición de crecimiento celular o citotóxicas pueden conjugarse adicionalmente con un agente citotóxico para hacerlos aún más potentes en destrucción de células tumorales. Pueden conferirse propiedades citotóxicas a un anticuerpo anti Ovr110, por ejemplo, conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado como se describe posteriormente. El agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento es preferentemente una molécula pequeña. Son preferibles toxinas tales como maitansina, maitansinoides, saporina, gelonina, ricina o caliqueamicina y análogos o derivados de los

mismos.

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

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

La invención también proporciona anticuerpos para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa Ovr110 o el alivio de uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti Ovr110 que se internaliza al mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpo pueden administrarse a corto plazo (agudas) o crónicas, o intermitentemente según indique el médico. También se proporcionan anticuerpos para su uso en la inhibición del crecimiento de, y destrucción de una célula que expresa Ovr110. Finalmente, se describen kits y artículos de fabricación que comprenden al menos un anticuerpo de la presente invención, preferentemente al menos un anticuerpo anti Ovr110 que se internaliza de la presente invención. Los kits que contienen anticuerpos anti Ovr110 encuentran uso en la detección de la expresión de Ovr110, o en ensayos terapéuticos o de diagnóstico, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células Ovr110 o para purificación y/o inmunoprecipitación de Ovr110 de células. Por ejemplo, para el aislamiento y purificación de Ovr110, el kit puede contener un anticuerpo anti Ovr110 acoplado con un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o perlas (por ejemplo, perlas de sepharose). Pueden proporcionarse kits que contienen anticuerpos para la detección y cuantificación de Ovr110 *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o una transferencia de Western. Dicho anticuerpo útil para la detección puede proporcionarse con un marcador tal como un marcador fluorescente o radiomarcador.

Producción de anticuerpos anti Ovr110

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

Como alternativa, pueden usarse células que expresan Ovr110 en su superficie celular (por ejemplo células CHO o NIH-3T3 transformadas para sobreexpresar Ovr110; línea celular tumoral ovárica, pancreática, de pulmón, de mama u otra que exprese Ovr110) o membranas preparadas de dichas células para generar anticuerpos. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de Ovr110 humano y murino están disponibles como se ha proporcionado anteriormente. Ovr110 puede producirse de forma recombinante en y aislarse de células procariotas, por ejemplo, células bacterianas, o células eucariotas usando metodología de ADN recombinante convencional. Ovr110 puede expresarse como una proteína marcada (por ejemplo, marcador epitópico) u otra proteína de fusión para facilitar su aislamiento así como su identificación en diversos ensayos.

Están disponibles como se desarrolla posteriormente anticuerpos o proteínas de unión que se unen con diversos marcadores y secuencias de fusión. Otras formas de Ovr110 útiles para generar anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia.

Marcadores

Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos marcadores y sus anticuerpos respectivos. Los ejemplos incluyen marcadores de poli histidina (poli-his) o poli histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido marcador HA de gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)); el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para el mismo (Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)); y el marcador de glucoproteína D de virus del Herpes Simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)). El péptido FLAG (Hopp *et al.*, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)) se reconoce por un anticuerpo monoclonal anti FLAG M2 (Eastman Kodak Co., New Haven, CT). La purificación de una proteína que contiene el péptido FLAG puede realizarse por cromatografía de inmunoafinidad usando una matriz de afinidad que comprende el anticuerpo monoclonal anti FLAG M2 unido covalentemente con agarosa (Eastman Kodak Co., New Haven, CT). Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido epitópico KT3 [Martin *et al.*, Science, 255: 192-

194 (1992)]; un péptido epitópico de α tubulina (Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)); y el marcador peptídico de proteína del gen T7 (Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)).

5 Anticuerpos policlonales

Se inducen anticuerpos policlonales preferentemente en animales, preferentemente animales no humanos, por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) con una proteína que es
 10 inmunogénica en la especie para inmunizar. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH), suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugación mediante restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes. También pueden realizarse conjugados en cultivo celular recombinante como
 15 fusiones proteicas.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 5-100 pg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales
 20 se refuerzan con de 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días después, se toman muestras sanguíneas de los animales y el suero se ensaya con respecto a título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título alcanza una meseta. Además, los agentes agregantes tales como alumbre se usan convenientemente para potenciar la respuesta inmunitaria.

25 Anticuerpos monoclonales

Pueden realizarse anticuerpos monoclonales usando el método de hibridoma descrito en primer lugar en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden realizarse por métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N°
 30 4.816.567). En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente para inducir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente con la proteína usada para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y después se fusionan con un "compañero de fusión", por ejemplo, una línea celular de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como
 35 polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies. Principles and Practice, pp 103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado conteniendo preferentemente dicho medio una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia del
 40 compañero de fusión, no fusionado, por ejemplo, las células de mieloma parentales. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), previniendo dichas sustancias el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

45 Las células de mieloma del compañero de fusión preferidas son las que se fusionan eficazmente, sostienen producción de anticuerpo a alto nivel estable por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales no fusionadas. Son líneas celulares de mieloma preferidas las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-II disponibles del Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, California Estados Unidos y SP-2 y
 50 derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockyville, Maryland Estados Unidos. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); y Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

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

60 La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard descrito en Murison *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980). Una vez que las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas se han identificado, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies:
 65 Principles and Practice, pp 103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen,

por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan convenientemente del medio de cultivo, líquido ascítico, o suero por procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o proteína G-sepharose) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

- Se aísla fácilmente ADN que codifica los anticuerpos monoclonales y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma actúan como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transforman o transfectan en células hospedadoras procariontes o eucariotas tales como, por ejemplo, células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de mieloma, que no producen de otro modo proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opinión in Immunol., 5: 256-262 (1993) y Phuckthun, Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992).
- Además, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por redistribución de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicionales para aislamiento de anticuerpos monoclonales.
- El ADN que codifica el anticuerpo puede modificarse para producir polipéptidos de anticuerpo quiméricos o de fusión, por ejemplo, sustituyendo con secuencias de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera humanas (CH y CL) las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison, *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. Estados Unidos, 81: 6851 (1984)), o fusionando la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias polipeptídicas no de inmunoglobulina pueden sustituir los dominios constantes de un anticuerpo, o pueden sustituir los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

40 Anticuerpos humanizados

- Se han descrito en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "de importación", que se toman típicamente de un dominio variable "de importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo con secuencias de región hipervariable las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.
- La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (de anticuerpo humano anti ratón) cuando se pretende que el anticuerpo sea para uso terapéutico humano. De acuerdo con el denominado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia de dominio V humana que es más cercana a la del roedor se identifica y la región marco conservada humana (FR) dentro de ella se acepta para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro método usa una región marco conservada particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con conservación de la afinidad de alta unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada.

- 5 Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos.

- Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas presentaciones
10 permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse restos FR y combinarse a partir de las secuencias receptoras y de importación de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de región hipervariable están indicados
15 directamente y más sustancialmente en la influencia sobre la unión a antígeno.

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

Anticuerpos humanos

- Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, es posible ahora
25 producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de región de unión a cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes de línea germinal y quimérica da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en
30 dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); Patente de Estados Unidos N° 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y, como alternativa, puede usarse tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y
35 fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominios V de anticuerpo se clonan en fase en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma de fago, las selecciones basadas en las
40 propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. Puede realizarse presentación en fagos en una diversidad de formatos, revisados en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos génicos V para presentación en fagos. Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una serie
45 diversa de anticuerpos anti oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véase, también, Patente de Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905.
50 Como se ha analizado anteriormente, también pueden generarse anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* (véase Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275).

Fragmentos de anticuerpo

- 55 En ciertas circunstancias el uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos, tiene ventajas. El menor tamaño de los fragmentos permite una eliminación rápida, y puede conducir a un acceso mejorado a tumores sólidos. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229: 81
60 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos
65 F(ab)2 (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos

F(ab)2 directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Se describen fragmentos Fab y F(ab)2 con semivida *in vivo* aumentada que comprenden restos de epítopos de unión a receptor de recuperación en la Patente de Estados Unidos N° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia. El anticuerpo elegido también puede ser un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos N° 5.571.894; y Patente de Estados Unidos N° 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por lo tanto, son adecuados para unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión scFv para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxilo terminal de un sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.641.870 por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse con dos epítopos diferentes de la proteína Ovr110. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a Ovr110 con un sitio de unión para otra proteína. Como alternativa, una rama anti Ovr110 pueden combinarse con una rama que se une con una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo C133), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para centrar y localizar mecanismos de defensa celular en la célula que expresa Ovr110. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan Ovr110. Estos anticuerpos poseen una rama de unión a Ovr110 y una rama que se une con el agente citotóxico (por ejemplo saporina, anti interferón α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab)2). El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti ErbB2/anti FcγRIII y la Patente de Estados Unidos N° 5.837.234 desvela un anticuerpo biespecífico anti ErbB2/anti FcγRI. Se muestra un anticuerpo biespecífico anti ErbB2/Fcα en el documento WO98/02463. La Patente de Estados Unidos N° 5.821.337 enseña un anticuerpo biespecífico anti ErbB2/anti CD3. Documento WO 96/16673, Patente de Estados Unidos N° 5.837.234, documento WO98/02463, Patente de Estados Unidos N° 5.821.337.

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al*, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad, es más bien incómoda, y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, y en Traunecker *et al*, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

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

Preferentemente, los anticuerpos biespecíficos en este enfoque se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se ha descubierto que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo de separación fácil. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210(1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse técnicamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se

recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales mayores (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos específicos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Se conocen bien en la técnica agentes de entrecruzamiento adecuados, y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejo con ditiol, arsenita sódica, para estabilizar ditioles vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después al Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse con células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron con las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo.

La tecnología de "diacuerpo" descrita en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un VH conectado con un VL por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios VH y VL de un fragmento a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno con el que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpo multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales de la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y

preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en la que la cadena o las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1(X1n-VD2-(X2)n-Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la

5 cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CHI-enlazador flexible-VH-CHI-cadena de región Fc; o VH-CHI-VH-CHI-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento comprende además preferentemente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente del presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a

10 aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos

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

20 Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti Ovr110. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución en la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo anti Ovr110, tales como

25 cambiar el número o posición de sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo anti Ovr110 que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells en Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un resto o grupo de restos diana dentro

30 del anticuerpo anti Ovr110 (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o con carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno de Ovr110.

Estas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después

35 introduciendo más u otras variantes en, o en lugar de, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de alanina o mutagénesis aleatoria en un codón o región diana y las variantes de anticuerpos anti Ovr110 expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

40 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en su longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo anti Ovr110 con un resto de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de

45 inserción de la molécula de anticuerpo anti Ovr110 incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo anti Ovr110 con una enzima (por ejemplo para ADEPT) o una fusión con un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de

50 aminoácido en la molécula de anticuerpo anti Ovr110 reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla I bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio de la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente

55 posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y explorarse los productos con respecto a una característica deseada.

TABLA I Sustituciones de aminoácidos

Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu

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

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

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

- 10 Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti Ovr110 también puede sustituirse, en general con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

- Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generan. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica maduración de afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una manera monovalente de partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y Ovr110 humano. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas desarrolladas en el presente documento. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se ha descrito en el presente documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

- 35 Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende suprimir uno o más restos de carbohidratos hallados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos es típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato

con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse por la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

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

- Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, puede introducirse un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron *et al.*, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.* Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede obtenerse técnicamente un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y puede tener por lo tanto capacidades de ADCC y lisis del complemento potenciadas. Véase Stevenson *et al.* Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

- 30 Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión a receptor de recuperación" se refiere a un epítipo de la región Fc del anticuerpo.

35 Exploración con respecto a anticuerpos con las propiedades deseadas

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

- 40 Los efectos inhibidores de crecimiento de un anticuerpo anti Ovr110 de la invención pueden evaluarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando células que expresan Ovr110 bien de forma endógena o bien después de transfección con el gen de Ovr110. Por ejemplo, las líneas celulares tumorales y células transfectadas con Ovr110 proporcionadas en el Ejemplo 1 posterior pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal anti Ovr110 de la invención a diversas concentraciones durante varios días (por ejemplo, 2-7) y teñirse con violeta cristal o MTT o analizarse por algún otro ensayo colorimétrico. Otro método para medir la proliferación sería comparando la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti Ovr110 de la invención. Después del tratamiento con anticuerpos, las células se recogen y la cantidad de radiactividad incorporada en el ADN se cuantifica en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento que se sabe que inhibe el crecimiento de esa línea celular. La inhibición de crecimiento de células tumorales *in vivo* puede determinarse de diversas maneras tal como se describe en la sección de Ejemplos Experimentales posterior. Preferentemente, la célula tumoral es una que sobreexpresa Ovr110. Preferentemente, el anticuerpo anti Ovr110 inhibirá la proliferación celular de una célula tumoral que expresa Ovr110 *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente 25-100 % en comparación con la célula tumoral no tratada, más preferentemente, en aproximadamente 30-100 %, y aún más preferentemente en aproximadamente 50-100 % o 70-100 %, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento puede medirse a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o de aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, en la que la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti Ovr110 a aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal da como resultado la reducción del tamaño tumoral o proliferación de células tumorales en un periodo de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en un periodo de aproximadamente 5 a 30 días.

- 65 Para seleccionar con respecto a anticuerpos que inducen la muerte celular, puede evaluarse la pérdida de integridad

- de membrana como se indica por, por ejemplo, la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD en relación con un control. Puede realizarse un ensayo de captación de PI en ausencia de complemento y células efectoras inmunitarias. Se incuban células tumorales que expresan Ovr110 con medio solamente o medio que contiene el anticuerpo monoclonal apropiado, por ejemplo, a aproximadamente 10 µg/ml. Las células se incuban durante un periodo de tiempo de 3 días. Después de cada tratamiento, las células se lavan y se separan en alícuotas en tubos de 12 x 75 tapados con tamiz de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por cada grupo de tratamiento) para la retirada de grupos celulares. Los tubos reciben después PI (10 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular como se determina por la captación de PI pueden seleccionarse como anticuerpos inductores de muerte celular. Los anticuerpos también modifican otras propiedades biológicas celulares relevantes para el cáncer u otros mecanismos inmunitarios incluyendo propiedades tales como la migración celular, adhesión celular, secreción de citocinas o del factor de crecimiento.
- Para explorar con respecto a anticuerpos que se unen con un epítipo en Ovr110 con el que se une un anticuerpo de interés, por ejemplo, los anticuerpos de Ovr110 de la presente invención, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo puede usarse para determinar si un anticuerpo de ensayo se une con el mismo sitio o epítipo que un anticuerpo anti Ovr110 de la invención. Como alternativa, o adicionalmente, puede realizarse mapeo de epítopos por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de anticuerpos puede mutarse tal como por exploración de alanina, para identificar restos de contacto. El anticuerpo mutante se ensaya inicialmente con respecto a unión con anticuerpo policlonal para asegurar el plegamiento apropiado. En un método diferente, pueden usarse péptidos correspondientes a regiones diferentes de Ovr110 en ensayos de competición con los anticuerpos de ensayo o con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.
- Por ejemplo, un método para explorar con respecto a anticuerpos que se unen con un epítipo con el que se une un anticuerpo de la presente invención puede comprender combinar una muestra que contiene Ovr110 con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo de la presente invención para formar una mezcla, el nivel de anticuerpo de Ovr110 unido a Ovr110 en la mezcla se determina después y se compara con el nivel de anticuerpo de Ovr110 unido en la mezcla con una mezcla de control, en el que el nivel de unión del anticuerpo de Ovr110 con Ovr110 en la mezcla en comparación con el control es indicativo de la unión del anticuerpo de ensayo con un epítipo con el que se une el anticuerpo anti Ovr110 de la presente invención. El nivel de anticuerpo de Ovr110 unido a Ovr110 se determina por ELISA. El control puede ser un control positivo o negativo o ambos. Por ejemplo, el control puede ser una mezcla de Ovr110, anticuerpo de Ovr110 de la presente invención y un anticuerpo que se sabe que se une con el epítipo con el que se une el anticuerpo de Ovr110 de la presente invención. El anticuerpo anti Ovr110 se marca con un marcador tal como los desvelados en el presente documento. El Ovr110 puede unirse con un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o con perlas, por ejemplo, perlas de sepharose.

Inmunoconjugados

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

Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados.

- También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides y un tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Maitansina y maitansinoides

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

- Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto Africano *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos N° 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (Patente de Estados Unidos N° 4.151.042). Se desvelan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Conjugados de maitansinoide-anticuerpo

- En un intento de mejorar su índice terapéutico, la maitansina y maitansinoides se han conjugado con anticuerpos que se unen específicamente con antígenos de células tumorales. Se desvelan inmunoconjugados que contienen

maitansinoides y su uso terapéutico, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.208.020, 5.416.064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DMI unido con el anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumor *in vivo*. Chari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjuga mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se unía con un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une con el oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie de HER-2 por célula. El conjugado farmacológico consiguió un grado de citotoxicidad similar al fármaco de maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

15 Conjugados de anticuerpo anti Ovr110-maitansinoide (inmunoconjugados)

Se prepararan conjugados de anticuerpo anti Ovr110-maitansinoide uniendo químicamente un anticuerpo anti Ovr110 con una molécula de maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas maitansinoides conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Se conocen bien en la técnica maitansinoides y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se desvelan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente indicadas anteriormente en el presente documento. Son maitansinoides preferidos maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tal como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 5.208.020 o Patente EP 0 425 235 B1, y Chari *et al.* Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos de tioéter, grupos lábiles por ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles por peptidasa o grupos lábiles por esterasa, como se ha desvelado en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter. Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y maitansinoide usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil (2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como his (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6 diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil (2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 [1978]) y N-succinimidil (2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

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

Caliqueamicina

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo anti Ovr110 conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir roturas de ADN bicatenarias a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase patentes de Estados Unidos 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1 , α_2 , α_3 , N-acetilo, γ_1 , PSAG y θ_1 , (Hinman *et al.* Cancer Research 53: 3336 (1993), Lode *et al.* Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos anteriormente mencionadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpo potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

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

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

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcadores tales como Tc^{99m} , I^{123} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse Itrio-90 mediante un resto de lisina. El método de IODOGEN (Fraker *et al* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) puede usarse para incorporar yodo. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como N-succinimidil (2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6 diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al*. Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil metildietilén triaminopentaacético marcado con carbono (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radinucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO 94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al*. Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti Ovr110 y agente citotóxico, por ejemplo mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El tramo de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

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

Terapia profarmacológica mediada por enzima dependiente de anticuerpo (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase documento WO 81/01145) en un fármaco antineoplásico activo. Véase, por ejemplo, documento WO 88/07378 y Patente de Estados Unidos N° 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma más activa, citotóxica. Las enzimas que son útiles en el método de la presente invención incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que

contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de aminoácidos D; enzimas de escisión de carbohidratos tales como O-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; P-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con P-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-abzima como se describe en el presente documento para suministro de la abzima a una población de células tumorales. Las enzimas de la presente invención pueden unirse covalentemente con los anticuerpos anti Ovr110 por técnicas bien conocidas en este campo tales como el uso de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales analizados anteriormente.

Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención unida con al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature, 312: 604-608 (1984)).

Otras modificaciones de anticuerpos

Otras modificaciones del anticuerpo se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse con uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxiálquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. El anticuerpo también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmecacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

Los anticuerpos anti Ovr110 desvelados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para el suministro de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas. Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Nati Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Se desvelan liposomas con tiempo en circulación potenciado en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin *et al.* J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989).

Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el anticuerpo anti Ovr110 humanizado, vectores y células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo. Para producción recombinante del anticuerpo, la molécula de ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o se inserta en un vector en enlace operativo con un promotor para expresión. Se aísla fácilmente ADN que codifica el anticuerpo monoclonal y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

Componente de secuencia señal

El anticuerpo anti Ovr110 de la presente invención puede producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia

señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal de anticuerpo nativo anti Ovr110, la secuencia señal se sustituye por una
 5 secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o líderes de enterotoxina termoestable II. Para secreción de levadura la secuencia señal nativa puede sustituirse, por ejemplo, por el líder de invertasa de levadura, líder de factor oc (incluyendo líderes de factor cc de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero
 10 así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal de gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica el anticuerpo anti Ovr110.

Origen de replicación

15 Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen bien para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la
 20 mayoría de bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levadura, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen SV40 puede usarse típicamente solamente porque contiene el promotor temprano).

25 Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o
 30 (c) aportan nutrientes típicos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para Bacilos. Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y por lo tanto sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante usa los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

35 Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico de anticuerpo anti Ovr110, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosín desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc. Por ejemplo, se identifican en primer lugar células transformadas con el gen de
 40 selección de DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster Chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

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

50 Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen de *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979)). El gen de *trp1* proporciona un marcador seleccionable para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4 Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de
 55 levadura proporciona después un ambiente eficaz para detectar la transformación por cultivo en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que portan el gen de Leu2.

Además, pueden usarse vectores derivados del plásmido circular de 1,6 pm pKDI para transformación de levaduras
 60 *Kluyveromyces*. Como alternativa, un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante se presentó para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). También se han desvelado vectores de expresión multicopia estables para secreción de albúmina de suero humano recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

Componente promotor

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

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

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

La transcripción del anticuerpo anti Ovr110 de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente Virus de Simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

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

Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti Ovr110 de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de anticuerpo anti Ovr110, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, de hongos, de insectos, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo anti Ovr110. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina. Véase documento WO 94/11026 y el vector de expresión

desvelado en el mismo.

Selección y transformación de células hospedadoras

- 5 Son células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W31 10 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.
- 10
- 15 Pueden producirse anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpos en bacterias, en particular cuando no es necesaria la función de glucosilación y efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado en sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más económica. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, documentos U.S. 5.648.237 (Carter *et al.*), U.S. 5.789.199 (Joly *et al.*), y U.S. 5.840.523 (Simmons *et al.*) que describe secuencias de región de inicio de la traducción (TIR) y señal para optimizar la expresión y secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y puede purificarse mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo de forma similar al proceso para purificar anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.
- 20
- 25

- Además de procariotas, son hospedadores de clonación o expresión adecuados microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura para vectores que codifican anticuerpos anti Ovr110. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadero común, es el más habitualmente usado entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están disponibles habitualmente y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.
- 30
- 35

- Células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo anti Ovr110 glucosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes a partir de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles públicamente una diversidad de cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus pueden usarse como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.
- 40
- 45

- También pueden utilizarse como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, *Arabidopsis* y tabaco. Se conocen por los expertos en la materia vectores de clonación y expresión útiles en la producción de proteínas en cultivo de células vegetales. Véase, por ejemplo, Hiatt *et al.*, Nature (1989) 342: 76-78, Owen *et al.* (1992) Bio/Technology 10: 790-794, Artsaenko *et al.* (1995) The Plant J 8: 745-750, y Fecker *et al.* (1996) Plant Mol Biol 32: 979-986.
- 50

- Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono Africano verde (VERO-76, ATCC CRL 1587); células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, 1413 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL5 1); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).
- 55
- 60

65

Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de anticuerpo anti Ovr110 y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

5 Cultivo de células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo anti Ovr110 de la presente invención pueden cultivarse en una diversidad de medios. Medios disponibles en el mercado tales como FIO de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, puede usarse cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patente de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patentes de Estados Unidos Re. 30.985 como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que se conocerán por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultará evidente para el experto habitual en la materia.

Purificación de anticuerpo anti Ovr110

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos en partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela la pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fenilmetilsulfoniilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

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

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

Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e

incluyen tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-creso); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tonificantes tales como trehalosa y cloruro sódico; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivo tal como polisorbato; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferentemente el anticuerpo a una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferentemente entre 10-100 mg/ml.

La formulación descrita en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente las que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, además del anticuerpo anti Ovr110 que se internaliza, puede ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo un segundo anticuerpo anti Ovr110 que se une con un epítipo diferente en Ovr110, o un anticuerpo para alguna otra diana tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer particular. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

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

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de L-ácido glutámico y γ-etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-) hidroxibutírico.

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

Métodos y tratamientos usando anticuerpos anti Ovr110

De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo anti Ovr110 que modula la actividad Ovr110 tras la unión con Ovr110 o se internaliza tras la unión con Ovr110 en una superficie celular se usa para tratar a un sujeto que lo necesite que tenga un cáncer caracterizado por células cancerosas que expresan Ovr110, en particular, cáncer ovárico, endometrial, de cabeza y cuello, de riñón, pancreático, de pulmón o de mama, tal como adenocarcinoma seroso ovárico o cáncer de carcinoma ductal de infiltración de mama, y metástasis asociadas.

El cáncer comprenderá generalmente células que expresan Ovr110, de modo que el anticuerpo anti Ovr110 sea capaz de unirse con las mismas. Aunque el cáncer puede caracterizarse por la sobreexpresión de la molécula de Ovr110, se describe adicionalmente un método para tratar el cáncer que no se considera que sea un cáncer que sobreexpresa Ovr110.

La presente invención también se refiere a métodos para detectar células que sobreexpresan Ovr110. También se describen kits de diagnóstico útiles para detectar células que expresan Ovr110 o para detectar Ovr110 en suero de un paciente. Los métodos pueden comprender combinar una muestra de ensayo que contiene células con un anticuerpo de la presente invención, ensayar la muestra de ensayo con respecto a unión del anticuerpo con células en la muestra de ensayo y comparar el nivel de unión a anticuerpo en la muestra de ensayo con el nivel de unión de anticuerpo en una muestra de control de células. Un control adecuado es, por ejemplo, una muestra de células normales del mismo tipo que la muestra de ensayo o una muestra celular que se sabe que está libre de células que sobreexpresan Ovr110. Un nivel de unión de Ovr110 mayor que el de dicha muestra de control sería indicativo de que la muestra de ensayo contiene células que sobreexpresan Ovr110. Como alternativa, el control puede ser una muestra de células que se sabe que contiene células que sobreexpresan Ovr110. En dicho caso, un nivel de unión

de anticuerpo de Ovr110 en la muestra de ensayo que es similar a, o superior a, el de la muestra de control sería indicativo de que la muestra de ensayo contiene células que sobreexpresan Ovr110.

La sobreexpresión de Ovr110 puede detectarse con diversos ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, la sobreexpresión de Ovr110 puede ensayarse por inmunohistoquímica (IHC). Pueden someterse a secciones tisulares incluidas en parafina de una biopsia tumoral al ensayo de IHC y asignárseles un criterio de intensidad de tinción de proteínas Ovr110 de la siguiente manera.

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

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

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

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

20 Los tumores con puntuaciones 0 o 1+ para expresión de Ovr110 pueden caracterizarse como tumores que no sobreexpresan Ovr110, mientras que los tumores con puntuaciones 2+ o 3+ pueden caracterizarse como tumores que sobreexpresan Ovr110.

Como alternativa, o adicionalmente, pueden llevarse a cabo ensayos de FISH tales como el INFORM™ (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION™ (VySiS, Illinois) en tejido tumoral fijado en formalina, incluido en parafina para determinar el alcance (si lo hubiera) de la sobreexpresión de Ovr110 en el tumor. La sobreexpresión o amplificación de Ovr110 puede evaluarse usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo administrando una molécula (tal como un anticuerpo de la presente invención) que se une con Ovr110 y que se marca con un marcador detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo o un marcador fluorescente) y explorando de forma externa al paciente con respecto a localización del marcador.

Se combina una muestra que se sospecha que contiene células que expresan o sobreexpresan Ovr110 con los anticuerpos de la presente invención en condiciones adecuadas para la unión específica de los anticuerpos con Ovr110. La unión y/o internalización de los anticuerpos de Ovr110 de la invención es indicativa de que las células expresan Ovr110. El nivel de unión puede determinarse y compararse con un control adecuado, en el que un nivel elevado de Ovr110 unido en comparación con el control es indicativo de sobreexpresión de Ovr110. La muestra que se sospecha que contiene células que sobreexpresan Ovr110 puede ser una muestra de células cancerosas, particularmente una muestra de un cáncer ovárico, por ejemplo adenocarcinoma ovárico seroso, o un cáncer de mama, por ejemplo, un carcinoma ductal de infiltración en mama. Una muestra de suero de un sujeto también puede ensayarse con respecto a niveles de Ovr110 combinando una muestra de suero de un sujeto con un anticuerpo de Ovr110 de la presente invención, determinando el nivel de Ovr110 unido con el anticuerpo y comparando el nivel con un control, en el que un nivel elevado de Ovr110 en el suero del paciente en comparación con un control es indicativo de la sobreexpresión de Ovr110 por células en el paciente. El sujeto puede tener un cáncer tal como por ejemplo un cáncer ovárico, por ejemplo adenocarcinoma ovárico seroso, o un cáncer de mama, por ejemplo, un carcinoma ductal de infiltración en mama.

En la actualidad, dependiendo del estadio del cáncer, el tratamiento de cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o de mama implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para retirar el tejido canceroso, radioterapia, privación de andrógenos (por ejemplo, terapia hormonal) y quimioterapia. La terapia de anticuerpo anti Ovr110 puede ser especialmente deseable en paciente ancianos que no toleren la toxicidad y efectos secundarios de quimioterapia bien, en enfermedad metastásica en la que la radiación o la quimioterapia tienen utilidad limitada. Los anticuerpos anti Ovr110 de internalización y dirección al tumor de la invención son útiles para aliviar cánceres que expresan Ovr110, por ejemplo, cánceres ovárico, pancreático, endometrial, de cabeza y cuello, de riñón, de pulmón o de mama tras el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti Ovr110 puede usarse solo, o en terapia de combinación con, por ejemplo, otros anticuerpos, productos quimioterapéuticos, hormonas, antiangiogénos o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia, notablemente para cánceres ovárico, pancreático, endometrial, de cabeza y cuello, de riñón, de pulmón o de mama, también particularmente cuando no puedan alcanzarse células desprendidas. El tratamiento con anticuerpo anti Ovr110 puede administrarse junto con otras formas de terapia convencional, bien de forma consecutiva con, antes de o después de terapia convencional, se usan fármacos quimioterapéuticos tales como Taxotere® (docetaxel), Taxol® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona en el tratamiento de cánceres ováricos, pancreáticos, de pulmón o de mama refractarios frente a hormonas y metastásicos, en particular, en pacientes con buen nivel de riesgo. Para el tratamiento o alivio del cáncer, en particular, cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o de mama metastásico y/o independiente de andrógenos, puede administrarse al paciente con cáncer anticuerpo anti Ovr110 junto con tratamiento con el o los agentes quimioterapéuticos precedentes. En particular, se contempla la

terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (véase, por ejemplo, documento EP0600517). El anticuerpo anti Ovr110 se administrará con una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico. El anticuerpo anti Ovr110 también puede administrarse junto con quimioterapia para potenciar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. The Physicians' Desk Reference (PDR) desvela dosificaciones de estos agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son terapéuticamente eficaces dependerán del cáncer particular que se trate, el alcance de la enfermedad y de otros factores con los que está familiarizado el médico experto en la materia y pueden determinarse por el médico.

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

Los anticuerpos anti Ovr110 o inmunoconjugados se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como una embolada o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. Los anticuerpos o inmunoconjugados pueden inyectarse directamente en la masa tumoral. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo. Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti Ovr110.

- 25 La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente hay un periodo de tiempo en el que ambos de (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferentemente dicha terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico.
- 30 También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos anti Ovr110, con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral asociado con el cáncer particular. Como tal, la presente invención también se dirige a un "cóctel" de anticuerpos que comprende uno o más anticuerpos de la presente invención y al menos otro anticuerpo que se une con otro antígeno tumoral asociado con las células tumorales que expresan Ovr110. El cóctel también puede comprender anticuerpos que se dirigen a otros epítopos de Ovr110. Preferentemente los otros anticuerpos no interfieren con la unión y/o internalización de los anticuerpos de la presente invención.

El método de tratamiento terapéutico de anticuerpos descrito en el presente documento puede implicar administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti Ovr110 y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalán, ciclofosfamida, hidroxurea e hidroxureataxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes o como se determina de forma empírica por el prácticamente experto en la materia. También se describen programas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1992).

- 50 El anticuerpo puede combinarse con un compuesto antihormonal; por ejemplo, un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifeno; una antiprogesterona tal como onapristona (véase, documento EP 616 812); o un antiandrógeno tal como flutamida, en dosificaciones conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer para tratar es un cáncer independiente de estrógeno, el paciente puede haberse sometido previamente a terapia antiestrógenos y, después de que el cáncer se haga independiente de estrógenos, el anticuerpo anti Ovr110 (y opcionalmente otros agentes como se describen en el presente documento) puede administrarse al paciente.

- 55 En ocasiones, puede ser beneficioso también coadministrar un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citocinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a la retirada quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia, antes, simultáneamente con, o después de la terapia de anticuerpos. Son dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores las usadas en la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y anticuerpo anti Ovr110.

- 65 Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación y el modo de administración se seleccionarán por el médico de acuerdo con criterios conocidos. La dosificación apropiada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad para tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el

anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente en una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Preferentemente, el anticuerpo se administra por infusión intravenosa o por inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de

5 aproximadamente 1 pg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo aproximadamente 0,1- 15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, bien, por ejemplo, en una o más administraciones separadas, o bien en infusión continua. Un régimen de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti Ovr110. Sin embargo, otros regímenes de

10 dosificación pueden ser útiles. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 pg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. El progreso de esta terapia puede controlarse fácilmente por métodos y ensayos convencionales y basándose en criterios conocidos por el médico u otros expertos en la materia.

15 Aparte de la administración de la proteína de anticuerpo al paciente, también se describe administración del anticuerpo por terapia génica. Dicha administración de una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo está abarcada por la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, documento WO 96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 con respecto al uso de la terapia génica para

20 generar anticuerpos intracelulares.

Existen dos enfoques principales para introducir la molécula de ácido nucleico (opcionalmente contenida en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para suministro *in vivo* la molécula de ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, habitualmente en el sitio en el que se requiere el anticuerpo. Para tratamiento *ex vivo*,

25 las células del paciente se retiran, la molécula de ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente bien directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo Patentes de Estados Unidos N° 4.892.538 y 5.283.187). Existe una diversidad de técnicas disponibles para introducir moléculas de ácido nucleico en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro*, o *in vivo*

30 en las células del hospedador pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación de fosfato cálcico, etc. Un vector habitualmente usado para suministro *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

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

40 Artículos de fabricación y kits

Se describe además un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para la detección de células que sobreexpresan Ovr110 y/o el tratamiento de cáncer que expresa Ovr110, en particular cáncer ovárico, pancreático,

45 de pulmón o de mama. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo que comprende un anticuerpo de la presente invención. La composición puede comprender además un vehículo. El artículo de fabricación también puede comprender una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz

50 para detectar células que expresan Ovr110 y/o tratar una afección cancerosa y pueden tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti Ovr110 de la invención. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para detectar células que expresan Ovr110 y/o para tratar cáncer ovárico, pancreático, de pulmón o de mama, o más específicamente adenocarcinoma

55 ovárico seroso o cáncer de carcinoma ductal de infiltración en mama, en un paciente que lo necesite. La etiqueta o el prospecto pueden comprender además instrucciones para administrar la composición de anticuerpo a un paciente con cáncer. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende una sustancia que detecta el anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, un segundo anticuerpo que se une con los anticuerpos de la presente invención. La sustancia puede marcarse con un marcador detectable

60 tal como los desvelados en el presente documento. El segundo recipiente puede contener, por ejemplo, un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se describen kits que son útiles para diversos fines, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células de Ovr110, para purificación o inmunoprecipitación de Ovr110 de células o para detectar la presencia de Ovr110 en una muestra de suero o detectar la presencia de células que expresan Ovr110 en una muestra de células. Para aislamiento y purificación de Ovr110, el kit puede contener un anticuerpo anti Ovr110 acoplado con un soporte sólido, por ejemplo, una placa de cultivo tisular o perlas (por ejemplo, perlas de sepharose). Pueden proporcionarse kits que contienen los anticuerpos para detección y cuantificación de Ovr110 *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o una transferencia de Western. Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una composición contenida en el mismo que comprende un anticuerpo de la presente invención. El kit puede comprender además una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los kits pueden comprender componentes adicionales, diluyentes y tampones, sustancias que se unen con los anticuerpos de la presente invención, por ejemplo, un segundo anticuerpo que puede comprender un marcador tal como los desvelados en el presente documento, por ejemplo, un radiomarcador, marcador fluorescente, o enzima, o el kit puede comprender también anticuerpos de control. Los componentes adicionales pueden estar dentro de recipientes separados dentro del kit. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso pretendido *in vitro* o de diagnóstico.

Ejemplos

Ejemplo 1: producción y aislamiento de hibridomas productores de anticuerpo monoclonal

Los siguientes MAb/hibridomas de la presente invención se describen posteriormente: Ovr110.Q1, Ovr110.Q3, Ovr110.Q4, Ovr110.Q5, Ovr110.Q6, Ovr110.Q7, Ovr110.Q8, Ovr110.Q9, Ovr110.Q10, Ovr110.Q11, Ovr110.Q12, Ovr110.Q13, Ovr110.Q14, Ovr110.Q15, Ovr110.Q16, Ovr110.Q17, Ovr110.Q18, Ovr110.Q19, Ovr110.Q20, Ovr110.Q21, Ovr110.Q23, Ovr110.Q24, Ovr110.Q25, Ovr110.Q26, Ovr110.Q27. Si el MAb se ha clonado, obtendrá la nomenclatura "X.1", por ejemplo, el primer clon de Ovr110.Q3 se denominará Q3.1, el segundo clon de Q3 se denominará Q3.2, etc. Para los fines de la presente invención, una referencia a Ovr110.Q3 o Q3 incluirá todos los clones, por ejemplo, Q3.1, Q3.2, etc.

Inmunógenos y antígenos

Para producción, exploración y caracterización de anticuerpos se prepararon diversas proteínas recombinantes, preparaciones de membrana y células transfectadas como se describe posteriormente.

Para las construcciones de Ovr110 descritas posteriormente, se insertaron moléculas de ácido nucleico que codificaban regiones de Ovr110 en diversos vectores de expresión para producir proteínas recombinantes. Estas secuencias de ácido nucleico se aislaron usando cebadores, cuyo diseño es rutinario por un experto en la materia. En algunos casos, los cebadores usados se incluyen en las descripciones debajo de cada construcción.

Para fines de ilustración, la secuencia de aminoácidos predicha codificada por cada construcción también se incluye. Sin embargo, las construcciones pueden incluir variantes de origen natural (por ejemplo variantes alélicas, SNP) dentro de la región Ovr110 como se aísla por los cebadores. Estas secuencias variantes, y anticuerpos que se unen con ellas se consideran parte de la invención como se describe en el presente documento.

Construcción 1 de Ovr110 (marcada con His)

Se insertó una molécula de ácido nucleico que codificaba la proteína Ovr110 de longitud completa, aminoácidos Met1 a Lys282, en un vector modificado que comprende una secuencia en el extremo 3' de sitio de clonación que codifica dos aminoácidos transicionales, Ala y Ser, y un marcador de 6 His. El vector resultante con el fragmento de ácido nucleico de Ovr110 insertado codifica una proteína de fusión de Ovr110 recombinante con el marcador de 6 His fusionado con el extremo C terminal de la proteína Ovr110. Este plásmido recombinante que codifica la proteína marcada con His Ovr110 de longitud completa se denomina en el presente documento "Construcción 1 de Ovr110". Una secuencia de aminoácidos representativa codificada por la Construcción 1 de Ovr110 se presenta en la SEC ID N°: 51.

Secuencia de Aminoácidos de Construcción 1 de Ovr110 (SEC ID N°: 51)

```
MASLGQILFWSIIISIIILAGAIALLIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQ
WLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGN
ANLEYKTGAFSMPEVNVVDYNASSETLRCEAPRWFQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKV
VSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSEFAISWALLPLSPYLM
LKASHHHHHH
```

La proteína Ovr110 expresada por la Construcción 1 se purificó en columna usando técnicas convencionales de cultivo celular de células 293F transfectadas con Construcción 1. Se sometieron muestras de fracciones recogidas a

SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western para evaluar la pureza de la proteína.

Ovr110-hFc (con TM)

- 5 Se insertó una molécula de ácido nucleico que codificaba la proteína Ovr110 madura, aminoácidos Gly30 a Lys282 en un vector modificado que comprendía una secuencia en el extremo 5' del sitio de clonación que codificaba una secuencia señal de secreción de aminoácidos de stanniocalcina 1 humana (STC) y una secuencia en el extremo 3' del sitio de clonación que codificaba dos aminoácidos transicionales, Ala y Ser, y región Fc humana (hFc). El vector resultante con el fragmento de ácido nucleico de Ovr110 insertado codifica una proteína de fusión de Ovr110
- 10 recombinante con una señal de secreción STC N terminal y un hFc fusionado con el extremo C terminal de la proteína Ovr110. Este plásmido recombinante que codifica la proteína de Ovr110-hFc madura se denomina en el presente documento "Construcción 2 de Ovr110". Una secuencia de aminoácidos representativa codificada por la Construcción 2 de Ovr110 se presenta en la SEC ID N°: 52.

- 15 Secuencia de aminoácidos de Construcción 2 de Ovr110 (SEC ID N°: 52)

MLQNSAVLLVLVISASADIGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHE
FKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPE
VNVVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVSVLYNVNTINNTYSCM
IENDIAKATGDIKVTESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYMLLKASTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SSGQPPENNYNTTTPMLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

- La proteína Ovr110 expresada por la Construcción 2 se purificó en columna usando técnicas convencionales del
- 20 cultivo celular de células 293 F transfectadas con Construcción 2. Se sometieron muestras de fracciones recogidas a SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western para evaluar la pureza de la proteína.

293F transfectadas de forma transitoria con Ovr110

- 25 Se transfectaron de forma transitoria células de la línea celular 293F de Invitrogen (Carlsbad, CA) para expresar Ovr110. Se clonó un molécula de ácido nucleico que codificaba los aminoácidos 1-282 de Ovr110 (Construcción 1 de Ovr110 sin el marcador de 6-His) en el vector de expresión de mamífero, PCDNA3.1, y el vector recombinante se usó para transfectar células 293F humanas (Invitrogen). Se transfectaron cincuenta ml de células 293F cultivadas en medio freestyle (Invitrogen) a 10^6 células/ml usando reactivo de transfección 293fectin (Invitrogen), de acuerdo con
- 30 las directrices del fabricante. Se mezclaron ADN, células y 293fectin en medio OPTI-MEM (GIBCO). Las células se usaron para análisis 48 horas después de la transfección. Las células 293F que expresan Ovr110 se denominan en el presente documento células 293F-Ovr110.

CHO transfectadas de forma estable con Ovr110

- 35 Se transfectaron de forma estable células CHO de hámster con el vector PCDN5/FRT/TO para preparar líneas celulares estables CHO-FlpIn siguiendo el protocolo de Invitrogen. Se cultivaron células CHO-FlpIn en medio HamsF12 con suero bovino fetal al 10 % (FBS). Se cotransfectó Ovr110 (Construcción 1 de Ovr110 sin el marcador de 6-His) con pOG44 Flp recombinasa en CHO-FlpIn con 2 µg de ADN de Ovr110, 18 µg de ADN de POG44 y
- 40 Lipofectamine 2000 en una placa de 6 pocillos como se describe en el protocolo de Invitrogen. Se realizó selección de transfectantes estables en medio HamsF12 + FBS 10 % con Higromicina B a 300 µg/ml durante 10-15 días después de la transfección.

- Se comprobaron las células resistentes a higromicina B con respecto a la expresión de proteína Ovr110 mediante
- 45 Transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal anti Ovr110. Las células que demostraron expresión de Ovr110 se expandieron, se aumentaron de escala, se criopreservaron en FBS con DMSO al 10 % y se almacenaron en Nitrógeno Líquido a -196 °C para asegurar el mantenimiento de cultivos de clones viables (12-15 clones de cada uno).

- 50 *RK3E transfectadas de forma estable con Ovr110*

- Se generaron células RK3E que expresaban de forma estable Ovr110 usando el sistema de expresión de retrovirus Phoenix (Orbigen, San Diego, CA). Se transfectó una molécula de ácido nucleico que codificaba los aminoácidos 1-282 de Ovr110 (Construcción 1 de Ovr110 sin el marcador de 6-His) insertada en el vector retroviral PLXSN
- 55 (pLAPSN, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) en células de empaquetamiento Phoenix-Eco. Dos días después, se recogieron los medios de cultivo y se filtraron a través de un filtro polisulfónico de 0,45 µm. Las células RK3E se dividieron a 5×10^5 células en placas de 10 cm el día antes de la infección. Se añadió polibreno 8 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al medio que contenía virus antes de su adición a las células diana. 7 horas después,

el medio del virus se reemplazó con medio de cultivo nuevo. Se seleccionaron células infectadas de forma estable con G418 0,5 mg/ml. Las células RK3E que expresan de forma estable Ovr110 se denominan en el presente documento células RK3E-Ovr110.

5 *Prep de membrana de CHO-Ovr110*

Para preps de membrana celular se suspendieron 760 millones de células CHO que expresaban Ovr110 (descrito anteriormente) en 20 ml de tampón hipotónico helado (tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, EGTA 1 mM con inhibición de proteasa). La muestra se homogeneizó con 30 golpes en un Belico Dounce de 25 ml con mortero suelto (A) y se dejó en hielo durante 15-20 minutos. La muestra se centrifugó a 200 rpm durante 5 minutos a 4 grados C en una centrífuga Beckman GS6KR. El sobrenadante se homogeneizó con 30 golpes en un Belico Dounce de 25 ml con mortero ajustado (B) y se dejó en hielo durante 15-20 minutos. La muestra se centrifugó a 20.000 rpm durante 1 hora a 4 grados C en centrífuga Beckman GS6KR. El sedimento contenía la fracción de membrana y se resuspendió en 2 ml de PBS antes de la confirmación de contenido por análisis de transferencia de western.

Inmunizaciones

Se inmunizaron ratones con preparaciones de membrana de células CHO transfectadas de forma estable con Ovr110 para generar MAb anti Ovr110 capaces de unirse con Ovr110 en fluidos corporales y en una superficie celular. Se inmunizaron ocho ratones BALB/c dos veces por semana durante cinco semanas. Se realizaron inmunizaciones por vía intradérmica en ambas almohadillas plantares posteriores con 10 µg de membranas CHO-Ovr110 en 25 µl de PBS por cada pie.

25 Fusión de hibridoma

Cuatro días después de la inmunización final, los ratones se sacrificaron y se redujo tejido de los ganglios linfáticos de drenaje (poplíteos) por disección estéril. Se dispersaron células de ganglios linfáticos usando una picadora tisular Tenbroeck (Wheaton N° 347426, VWR, Brisbane, CA) seguido de paso a través de un tamiz estéril (VWR) en DMEM y retirada de los linfocitos T mediante perlas magnéticas recubiertas con anti CD90 (Thy1.2) (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Alemania).

Estas células de ganglios linfáticos enriquecidas con linfocitos B primarios se immortalizaron después por fusión electrocelular (BTX, San Diego, CA) con la línea celular de mieloma continua P3x63Ag8.653 (Kearney, J. F. *et al*, J. Immunology 123: 1548-1550, 1979). El mieloma y los linfocitos B se agruparon a una relación de 1:1 para la fusión. Estos cultivos de fusión se distribuyeron a 2 millones de células por placa en pocillos de placas de cultivo de 96 pocillos (Costar N° 3585, VWR). Se seleccionaron células fusionadas con éxito cultivando en medio de selección (DMEM/FBS 15 %) que contiene Azaserina 2,85 µM, Hipoxantina 50 µM (HA) (Sigma) o Hipoxantina 50 µM, Aminopterina 0,2 µM, Timidina 8 µM (HAT) (Sigma) complementado con IL-6 humana recombinante (Sigma) a 0,5 ng/ml. Los cultivos se traspasaron a medio (DMEM/FBS 10 %) sin selección y complementos de IL-6 para expansión continuada y producción de anticuerpos.

Se exploraron sobrenadantes de pocillos por inmunoensayo de fase sólida ligado a enzimas (ELISA), citometría de flujo e internalización de anticuerpos para reactividad contra Ovr110. Se establecieron cultivos monoclonales, consistentes en la descendencia genéticamente uniforme de células individuales, después del procedimiento de exploración, clasificando células viables individuales en pocillos de dos placas de 96 pocillos, usando citometría de flujo (Coulter Elite; Beckman-Coulter, Miami, FL). Los cultivos de hibridoma de linfocitos B murinos resultantes se expandieron usando técnicas de cultivo tisular convencionales. Los hibridomas seleccionados se crioconservaron en suero bovino fetal (FBS) con DMSO 10 % y se almacenaron en nitrógeno líquido a -196 °C para asegurar el mantenimiento de cultivos de clones viables.

Exploración de ELISA y selección de hibridomas que producen anticuerpos específicos de Ovr110

Se seleccionaron líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpo específico de Ovr110 mediante ELISA de tipo sándwich y ELISA celular.

ELISA de tipo sándwich

Se adsorbió de forma no específica antisuero de cabra específico para Fc IgG humano y con reactividad cruzada mínima con Fc de ratón (2 µg/ml en PBS; 100 µl/pocillo; Jackson Immunoresearch P/N 109-005-098, West Grove, PA) en la superficie de las placas de EIA incubando durante una noche a 4 °C. Los pocillos de las placas se vaciaron y se bloqueó la capacidad de unión no específica llenando los pocillos (300 µl/pocillo) con TBST/albumina de suero bovino 0,5 % (TBST/BSA) e incubando durante > de 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Los pocillos se vaciaron y se llenaron con 100 µl de Ovr110-hFc recombinante (codificado por la Construcción 2 de Ovr110) a 1

µg/ml en TBST/BSA (descrito anteriormente). Después de incubación de > de 1 h, los pocillos se vaciaron y se llenaron con TBST/BSA 50 µl/pocillo. Se añadió muestra de medio de cultivo de hibridoma a los pocillos (50 µl) y se incubó durante 1 hora. Los pocillos se lavaron 3 veces con TBST. Se añadieron cien µl de IgG de cabra anti ratón (Fc) conjugado con fosfatasa alcalina con reactividad cruzada mínima con Fc humano (P/N115-055-071, Jackson ImmunoResearch), diluido 1:5000 en TBST/BSA, a cada pocillo y se incubó durante > 1 hora. Los pocillos se lavaron 3 veces con TBST. Se añadieron 100 µl de sustrato de fosfatasa alcalina paranitrofenilfosfato (pNPP) (Sigma) a 1 mg/ml en tampón de Dietanolamina 1 M pH 8,9 (Pierce) a cada pocillo y se incubó durante 20 minutos. La reacción enzimática se cuantificó midiendo la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 405 nm. Los sobrenadantes de hibridoma que producían un valor de absorbancia de más de 0,50 se consideraron específicos de Ovr110.

ELISA celular

Para el ELISA Celular, se evaluó la unión de los anticuerpos con células RK3E transducidas de forma estable con Ovr110 (RK3E-Ovr110) o fosfatasa alcalina (RK3E-AP; control negativo). Se sembraron 25.000 células en 100 µl de medio de cultivo por pocillo de una placa de 96 pocillos recubierta con Poli-D-Lisina (Nº 15600, Pierce). Las células se incubaron durante una noche, y se añadieron 50 µl de sobrenadante de hibridoma a cada pocillo. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos. Los pocillos se vaciaron y se lavaron con TBST/BSA. Las células se fijaron después durante 10 minutos en hielo añadiendo 100 µl de formaldehído a 4 % en TBS. Los pocillos se vaciaron y se lavaron con TBST/BSA. Se añadieron 300 µl de TBST/BSA a cada pocillo. Después de incubación de las células durante 30 minutos, los pocillos se vaciaron y se lavaron dos veces con TBST/BSA. Se añadieron 100 µl de IgG de conejo anti ratón (Fab2) conjugado con biotina (P/N315-066-046; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), diluido 1:20.000 en TBST/BSA, por cada pocillo para teñir las células. Después de 30 minutos de incubación, los pocillos se vaciaron y se lavaron dos veces con TBST/BSA. Se añadieron 100 µl de conjugado de Estreptavidina-HRP (Nº 21126; Pierce), diluido 1:20.000 en TBST/BSA, a cada pocillo y las células se incubaron durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron dos veces con TBST/BSA. Se añadieron 100 µl de sustrato de HRP 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Nº S1599; Dako Cytomation, Carpinteria, CA). La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de ácido clorhídrico 1 N, habitualmente después de 20 minutos. La reacción enzimática se cuantificó midiendo la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 450 nm. Los sobrenadantes de hibridoma que producían una relación de valores de DO de RK3E-Ovr110 a RK3E-AP de > 1,5 se consideraron específicos de Ovr110.

Los hibridomas que secretaban anticuerpo específico de Ovr110 se designaron Q1, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9, Q10, Q11, Q12, Q13, Q14, Q15, Q16, Q17, Q18, Q19, Q20, Q21, Q23, Q24, Q25, Q26 y Q27.

35 Exploración por citometría de flujo con respecto a unión con superficie celular de anticuerpos de Ovr110

Se analizaron sobrenadantes de hibridoma seleccionados por citometría de flujo con respecto a tinción de superficie celular de células 293F transfectadas con Ovr110 y líneas celulares tumorales. Se usaron las siguientes líneas celulares tumorales: SKBR3, ZR-75-1 y HeLa. Las células SKBR3 y ZR75-1 expresan ARN de Ovr110 como se determina por QPCR y proteína Ovr110 como se determina por Transferencia de Western. Las células HeLa no expresan ARN de Ovr110 o proteína.

Se transfectaron de forma transitoria células 293F con el Ovr110 (descrito anteriormente) usando 293fectin (Invitrogen) como reactivo de transfección. 48 horas después de la transfección, las células se lavaron una vez con 10 ml de DPBS sin $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ y después se añadieron 7 ml de Cellstripper caliente (37 °C) (Mediatech, Herndon, VA) por cada matraz de 150 cm². Las células se incubaron después durante 5 minutos a 37 °C con golpeo del matraz para retirar células unidas estrechamente. Las células se retiraron y se pipetearon varias veces para romper los agregados, después se colocaron inmediatamente en DMEM/FBS 10 %/butirato sódico 5 mM. Las células se sedimentaron después por centrifugación durante 5 minutos a 1300 rpm y se resuspendieron en DMEM/FBS 10 %/butirato sódico 5 mM. Las células se incubaron a 37 °C durante un periodo de recuperación de 30 minutos. Antes de la tinción, la viabilidad de las células se midió usando Guava Viacount (Guava Cytometers, Foster City, CA) y se seleccionaron cultivos con > 90 % de viabilidad para tinción con MAb.

Se separaron en alícuotas células de cultivos seleccionados para tinción con MAb a $0,5-1,0 \times 10^6$ células/pocillo en placas de fondo en v de 96 pocillos (VWR) y se centrifugaron durante 2 minutos a 1500 rpm. Los sobrenadantes se aspiraron y las placas se agitaron brevemente en un mezclador vortical para resuspender las células, después se añadieron 200 µl de DPBS/FBS 3 %/Azida sódica 0,01 % (tampón de FACS) a cada pocillo. Se repitió la centrifugación y aspiración, después se añadieron 25 µl de diluciones secuenciales de sobrenadante de hibridoma o MAb purificado a las células. Las placas se almacenaron en hielo durante 15 minutos, después se lavaron y se centrifugaron como antes, en 200 µl de tampón de FACS. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces y después se añadieron 25 µl de anticuerpo Fc de burro anti IgG de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a células. Después de 15 minutos en hielo las células se lavaron dos veces, como anteriormente, y después se resuspendieron en 250 µl de tampón FACS para análisis en el separador celular o citómetro de flujo. En ciertos casos, para almacenamiento durante una noche a 4 °C antes de su análisis, se

añadieron a cada pocillo 133 µl de tampón FACS y 67 µl de paraformaldehído/DPBS al 1 %, para fijación, después el volumen se aumentó a 250 µl con DPBS. Se analizaron células teñidas en un separador celular activado por fluorescencia Elite (FACS) (Beckman-Coulter).

- 5 La mayoría de los sobrenadantes de hibridoma reaccionaron fuertemente con células 293F transfectadas con Ovr110 y células tumorales positivas para Ovr110, y no mostraron unión o la mostraron débil con células negativas para Ovr110. Los anticuerpos para ricina que no se localizan en la superficie celular y CD71 que se localiza en la superficie celular actuaron como controles negativo y positivo, respectivamente. Se muestran los resultados de la tinción de superficie celular en las tablas 1 y 2.

10

Tabla 1. Tinción de superficie celular de células que expresan Ovr110 con sobrenadantes de hibridoma

Muestra	Células 293F transfectadas con Ovr110		Células 293F no transfectadas	
	% de Células Positivas	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)	% de Células Positivas	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)
Anti Ricina	1,6	0,297	0,9	0,278
Anti-CD71	97,9	9,15	95	4,21
Ovr110.Q1	96,2	23,3	1,1	0,29
Ovr110.Q3	95,3	13,6	1	0,287
Ovr110.Q4	89,8	8,32	1,7	0,311
Ovr110.Q5	84,6	4,89	0,8	0,273
Ovr110.Q6	97,4	7,12	71,1	1,27
Ovr110.Q7	27	1,02		
Ovr110.Q8	2,5	0,331		
Ovr110.Q9	84,3	1,96	83,5	1,72
Ovr110.Q10	1,8	0,317		
Ovr110.Q11	95,7	26	0,7	0,282
Ovr110.Q12	96,6	31,8	0,8	0,29
Ovr110.Q13	2,1	0,316		
Ovr110.Q14	97	28,2	1,6	0,326
Ovr110.Q15	97,3	32,9	0,8	0,277
Ovr110.Q16	22,2	0,49		
Ovr110.Q17	97,5	30,5	0,8	0,296
Ovr110.Q18	3,9	0,341		
Ovr110.Q19	95,7	24,5	1,2	0,309
Ovr110.Q20	99,8	12,9	1,2	0,293
Ovr110.Q21	18,7	0,45		
Ovr110.Q23	94,7	17,9	0,6	0,296
Ovr110.Q24	3,2	0,36		
Ovr110.Q25	96,8	25,3	4	0,371
Ovr110.Q26	89,2	8,08	0,9	0,286
Ovr110.Q27	91,8	6,09	0,8	0,278

Tabla 2. Tinción de superficie celular de líneas celulares tumorales con sobrenadantes de hibridoma.

Muestra	SKBR3		HeLa	
	% de Células Positivas	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)	% de Células Positivas	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)
Anti Ricina	0,9	0,255	1,1	0,261
Anti-CD71	97,5	15,1	99,2	11,1
Ovr110.Q1	95,3	3,76	1	0,27
Ovr110.Q3	54,9	1,01	0,7	0,266
Ovr110.Q4	23,7	0,678	8,5	0,32
Ovr110.Q5	1,3	0,259		
Ovr110.Q6	84,1	1,06	98,5	3,67
Ovr110.Q7	63,5	1,6	16,3	0,367
Ovr110.Q8	12,4	0,346	15	0,367
Ovr110.Q9	56,6	0,919	87,7	1,68

Muestra	SKBR3		HeLa	
	% de Células Positivas	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)	% de Células Positivas	Intensidad de Fluorescencia Media (IFM)
Ovr110.Q10	4	0,289		
Ovr110.Q11	98,7	9,71	0,6	0,25
Ovr110.Q12	98,8	12	4,2	0,295
Ovr110.Q13	42,8	0,945	76,8	1,44
Ovr110.Q14	97,3	5,82	12,9	0,348
Ovr110.Q15	98,6	10,5	0,8	0,253
Ovr110.Q16	4,5	0,288		
Ovr110.Q17	97,4	6,67	0,6	0,253
Ovr110.Q18	18,6	0,649		
Ovr110.Q19	98,9	10,4	8,1	0,328
Ovr110.Q20	79,6	1,18	97,9	4,49
Ovr110.Q21	7,9	0,325		
Ovr110.Q23	97,1	4,35	3,4	0,303
Ovr110.Q24	44	0,916	82,3	1,82
Ovr110.Q25	97,4	4,95	24,5	0,815
Ovr110.Q26	8,3	0,314		
Ovr110.Q27	87,7	1,48	1	0,265

Basándose en los datos de ELISA y experimentos de citometría de flujo, se seleccionaron los siguientes hibridomas para clonación de una única célula en placas de cultivo de 96 pocillos por clasificación celular (Coulter Elite): Q1, Q3, Q11, Q12, Q15, Q19, Q23 y Q27. Después de 2 semanas de cultivo, los sobrenadantes de hasta 3 clones de hibridoma de cada hibridoma parental se ensayaron con respecto a tinción de células 293F transfectadas con Ovr110 por citometría de flujo. Los anticuerpos se purificaron a partir de sobrenadantes de clones seleccionados y se volvieron a analizar por tinción de células 293F transfectadas con Ovr110 y células tumorales. Se incluyeron como controles MAb anti Ovr110 C3.2 y C6.3 que se obtuvieron de ratones inmunizados con Ovr110 recombinante. La generación y caracterización de anticuerpos de Ovr110.C3.2 y Ovr110.C6.3 se ha descrito previamente en los documentos PCT/US2004/014490 y PCT/US2005/040707. Los resultados se muestran en las tablas 3 y 4. Todos los MAb Q seleccionados reconocen proteína Ovr110 nativa en la membrana plasmática de células 293F transfectadas y en células tumorales. La intensidad de tinción de los MAb de serie Q, particularmente Q1.2, Q11.12.3, Q12.2, Q15.2, Q19.6, Q23.6 y Q27.4, demostró la unión con células vivas de células que expresaban Ovr110 (transfectadas y células tumorales positivas para Ovr110) que era igual o mayor que los MAb de control positivo C3.2 y C6.3.

Tabla 3. Tinción de superficie celular de células 293F transfectadas con Ovr110 con MAb purificados.

	Células 293F transfectadas con Ovr110		Células 293F transfectadas con simulación	
	% de Células Positivas	IFM	% de Células Positivas	IFM
Anti-Ricina	1,1	0,27	0,9	0,292
Anti-CD71	98,4	10	91,6	5,1
C3.2	91,1	3,5	3,9	0,343
Q1.2	92,8	4,53	12,2	0,433
Q3.1	93,6	4,12	4,9	0,379
Q11.12.3	93,8	5,47	40,4	0,959
Q12.2	94,3	5,25	34,1	0,81
Q15.2	94,2	5,49	33,3	0,765
Q19.6	91,9	5,25	42	1
Q23.6	92,6	4,98	33,7	0,773
Q27.4	95,2	5,48	34	0,799

Tabla 4: Tinción de superficie celular de células tumorales con MAb purificados.

	ZR-75-1		SKBR3		HeLa	
	% de Células Positivas	IFM	% de Células Positivas	IFM	% de Células Positivas	IFM
Anti Ricina	1,4	0,27	0,9	0,29	1,1	0,30
Anti-CD71	74,6	0,96	99,2	12,40	99,5	9,39
C3.2	32,1	0,46	25,6	0,52	0,6	0,23
C6.3	60,7	0,68	39,6	0,71	4,9	0,37
Q1.2	76,9	1,50	86,5	2,76	0,7	0,24
Q3.1	45,1	0,59	54,2	0,89	3,3	0,31
Q11.12.3	96,4	4,68	98,4	5,95	0,6	0,23
Q12.2	94,1	3,76	95,3	4,86	0,7	0,24
Q15.2	93	2,78	87,9	2,77	0,5	0,23
Q19.6	95,6	4,11	95,2	4,64	0,4	0,24
Q23.6	92,7	3,25	93,9	3,85	0,3	0,22
Q27.4	93,3	2,92	94,8	3,90	0,5	0,24

Isotipos de MAb de Ovr110

- 5 Los isotipos de los MAb anti Ovr110 se determinaron usando kits de ensayo de inmunoensayo de isotipación de anticuerpos monoclonales de ratón disponibles en el mercado (IsoStrip, Roche Diagnostic Corp., Indianápolis, IN). Los resultados de la isotipación se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5: isotipos de MAb de Ovr110

Clon	Isotipo
Q3.1	IgG1 kappa
Q11.12.3	IgG1 kappa
Q12.2	IgG1 kappa
Q15.2	IgG1 kappa
Q19.6	IgG1 kappa
Q23.6	IgG1 lambda
Q27.4	IgG1 kappa

10

Mediciones de afinidad de anticuerpos de Ovr110*ELISA y citometría de flujo*

- 15 La unión de anticuerpos de Ovr110 con proteína Ovr110 recombinante y nativa se analizó por ELISA directo, ELISA de tipo sándwich y citometría de flujo. Para el ELISA directo, las placas se recubrieron durante una noche con 100 µl de proteína Ovr110 recombinante a 1 µg/ml en PBS. Los pocillos se vaciaron y se bloquearon durante > 30 minutos con 300 µl de TBST/BSA. Los pocillos se vaciaron, se lavaron con 300 µl de TBST, y se llenaron con 100 µl de anticuerpo a 1 µg/ml en TBST/BSA. Después de incubación durante 1 hora, los pocillos se lavaron y se detectó el anticuerpo unido como se ha descrito en el protocolo de ELISA de tipo Sándwich.

20

Se realizaron experimentos de ELISA de tipo sándwich y citometría de flujo como se ha descrito anteriormente, excepto que se usaron anticuerpos purificados (a 1 µg/ml en TBST/BSA) en lugar de sobrenadantes de hibridoma.

- 25 Se codificó proteína Ovr110 recombinante usada para ELISA directo y de tipo sándwich por la Construcción 1 y 2 de Ovr110, respectivamente. Se usaron células ZR75-1 que expresaban de forma nativa Ovr110 para experimentos de citometría de flujo.

- La Tabla 6 enumera las relaciones de unión de anticuerpos de Ovr110 específicos para el anticuerpo de control negativo anti ricina. Se enumeran las relaciones de valores de DO (para experimentos de ELISA) o valores de IFM (para experimentos de citometría de flujo) de anticuerpos específicos frente al anticuerpo de control negativo anti ricina.

30

Tabla 6: unión de anticuerpos de Ovr110 con proteína Ovr110 recombinante y nativa.

	ELISA directo	ELISA de tipo sándwich	Citometría de flujo
x ricina	1,0	1,0	1,0
A87.1	31,3	17,7	2,2
C6.3.2.1.2	34,4	18,5	2,5
Q11.12.3	7,3	9,3	17,3
Q12.2	3,6	3,3	13,9
Q19.6	7,2	6,8	15,2
Q23.6	6,0	3,9	12,0
Q27.2	13,2	7,5	10,7

Los anticuerpos de la serie A y C como se representan por Ovr110.A87.1 y Ovr110.C6.3.2.1.2 se unen muy bien con la proteína Ovr110 recombinante, sin embargo la unión con Ovr110 nativo en células ZR75-1 es más débil. Los anticuerpos de la serie Q no se unen tan fuertemente con proteína Ovr110 recombinante como los anticuerpos de la serie A y C, pero se unen muy bien con Ovr110 nativo en células ZR75-1.

Constantes de disociación

- 10 Para determinar la afinidad de los anticuerpos de la serie Q anti Ovr110 por la proteína Ovr110 nativa, los anticuerpos se marcaron con NHS-Fluoresceína (N° 46100, Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos marcados se incubaron con 100.000 células ZR75-1 en tampón FACS durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos se usaron a 6 concentraciones diferentes que variaban de 160 nM a 5 nM. Las células se lavaron dos veces en tampón FACS para retirar el anticuerpo no unido y la intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células se analizó por citometría de flujo. Se restaron los valores de IFM generados por un anticuerpo de control negativo de los valores de IFM generados por anticuerpos anti Ovr110 a concentraciones de anticuerpo equivalentes. Las curvas de unión (valores de IFM netos representados frente a la concentración de anticuerpo) se analizaron con el software Prism (GraphPad). La constante de disociación KD se calculó por regresión no lineal suponiendo un modelo de unión de un sitio. Los resultados se resumen en la tabla 7 posterior.

Tabla 7: constantes de disociación de anticuerpos de Ovr110.

mAb	KD [nM]
Q11.12.3	0,74
Q12.2	0,64
Q19.6	0,53
Q23.6	5,66
Q27.4	4,76
C6.3.2.1.2	33,05

- Como se ha demostrado anteriormente, los anticuerpos de la serie Q anti Ovr110 tienen una mayor afinidad por Ovr110 nativo que los anticuerpos de la serie C tales como Ovr110.C6.3.2.1.2. Los anticuerpos Q11.12.3, Q12.2 y Q19.6 se unen muy fuertemente con la proteína Ovr110 nativa en células ZR75-1 con constantes de disociación de 0,74 nM, 0,64 nM y 0,53 nM, respectivamente.

- La unión preferente de los anticuerpos anti Ovr110 con Ovr110 nativo y alta afinidad por Ovr110 nativo demuestra que los anticuerpos anti Ovr110 son útiles como agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un anticuerpo con afinidad de intervalo nanomolar o picomolar se considera útil como un agente terapéutico. Los MAb de Ovr110 Q11.12.3, Q12.2, Q19.6, Q23.6 y Q27.4 tienen valores de KD y características de unión (unión en células vivas) que demuestran su utilidad como agentes terapéuticos. Estas características demuestran que los anticuerpos de serie Q anti Ovr110 están mejor adaptados para su uso como agentes de diagnóstico o terapéuticos que los anticuerpos anti Ovr110 descritos previamente.

Caracterización estructural de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo IgG de Ovr110

- Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de IgG de los anticuerpos de hibridomas Q11, Q12, Q19, Q23 y Q27 se determinaron usando kits disponibles en el mercado, por ejemplo el Mini Kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) y el Sistema 5'RACE (Invitrogen). Las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos se evaluaron usando el sistema de Kabat de determinación de región CDR (Kabat *et al.* Sequences of proteins of immunological interest, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) para identificar las regiones CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las regiones CDR1, CDR2 y

CDR3 de cadena ligera. Las regiones CDR1 de cadena pesada de los anticuerpos se determinaron como se describe en Clothia y Lesk (J. Mol. Biol. (1987) 196, 901-917).

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de Ovr110.Q11 se muestran en SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 3, 4 y 5, respectivamente.

Ovr110.Q11_LCVD.na, SEC ID N°: 1:

GAAAATGTTCTCAGGAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGTAGT
GCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAGCACCTCCCCAAACTCTGGATTTAT
GACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAAACTCCTACTCTCTC
ACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTACAG
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACGGGCTGAT

Ovr110.Q11_LCVD.aa, SEC ID N°: 2:

ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWIYDTSKLSGVPGRFSGSGSGNSYSL
TISSMEAEDVATYYCFQSGYPFTFGSGTKLEIKRAD

Ovr110.Q11_LCVD_CDR1, SEC ID N°: 3:

SASSSVSYMH

Ovr110.Q11_LCVD_CDR2, SEC ID N°: 4:

DTSKLS

Ovr110.Q11_LCVD_CDR3, SEC ID N°: 5:

FQSGYPFT

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Ovr110.Q11 se muestran en SEC ID N°: 6 y 7, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 8, 9 y 10, respectivamente.

Ovr110.Q11_HCVD.ria, SEC ID N°: 6:

GATGTACAGCTTCAGGAGTCCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGCTCTGTC
ACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTTCTGGAGCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAATGG
ATGGGCTTCATAAGCTACGACGGTACCAATAGCTACAACCCATCTCTCAAAAAATCGGATCTCCATTACTCGT
GACACATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAGGTTGAATTCTGTGACTAAAGAGGACACAGCTACATATTACTGT
GCCAGGAAGTTACTATGGCTACGCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAA
ACG

Ovr110.Q11_HCVD.aa, SEC ID N°: 7:

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSGYFWSWIRQFPGNKLEWMGFISYDGTNSYNPSLKNRISITR
DTSKNQFFLRRLNSVTKEDTATYYCARKLLWLRFDYWGQGTTLTVSSAKT

Ovr110.Q11_HCVD_CDR1, SEC ID N°: 8:

GYSITSGYFWS

Ovr110.Q11_HCVD_CDR2, SEC ID N°: 9:

FISYDGTNSYNPSLKN

Ovr110.Q11_HCVD_CDR3, SEC ID N°: 10:

KLLWLRFDY

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de Ovr110.Q12 se muestran en SEC ID N°: 11 y 12, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 13, 14 y 15, respectivamente.

5 Ovr110.Q12_LCVD.na, SEC ID N°: 11:

CAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGT
GCCAGCTCAGGTATAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCACCACCCCCAAAAGATGGATTTAT
GACGCATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTATTCTCTC
ACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCATCAGCGGCGTAGTTACCCATTCACG
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGAT

Ovr110.Q12_LCVD.aa, SEC ID N°: 12:

10 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSGISYMHYQKPGTTPKRWIYDASKLASGVPSRFSGSGSGTSYSL
TISSMEAEDAATYYCHQRRSYPFTEFGSGTKLEIKRAD

Ovr110.Q12_LCVD_CDR1, SEC ID N°: 13:

15 SASSGISYMH

Ovr110.Q12_LCVD_CDR2, SEC ID N°: 14:

DASKLAS

20 Ovr110.Q12_LCVD_CDR3, SEC ID N°: 15:

HQRRSYPFT

25 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Ovr110.Q12 se muestran en SEC ID N°: 16 y 17, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 18, 19 y 20, respectivamente.

Ovr110.Q12_HCVD.na, SEC ID N°: 16:

30 CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTACAGTGAAGCTGTCCTGCAAGACT
TCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATC
GGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTTATACTAATAACAATCAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTA
GACACATCCTCCACCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTACTGT
GCAAGAGAGTATGGTAACAACGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCC
AAAACG

Ovr110.Q12_HCVD.aa, SEC ID N°: 17:

35 QVQLQQPGAELVKPGATVKLSCKTSGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKFKGKATLTV
DTSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREYGNNDAMDYWGQTSVTVSSAKT

Ovr110.Q12_HCVD_CDR1, SEC ID N°: 18:

GYTFTSYWMH

40 Ovr110.Q12_HCVD_CDR2, SEC ID N°: 19:

EIDPSDSYTNYNQKFKG

45 Ovr110.Q12_HCVD_CDR3, SEC ID N°: 20:

EYGNNDAMDY

50 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de Ovr110.Q19 se muestran en SEC ID N°: 21 y 22, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 23, 24 y 25, respectivamente.

Ovr110.Q19_LCVD.na, SEC ID N°: 21:

GAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGTATATCTAGGGGAAAAGGTCACCATGACCTGCAGT
GCCAGCTTAAGTGTAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAAGCACCTCCCCAACTCTGGATTTAT
GACACATCCAAAGTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACTCTTATTCTCTC
ACGATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCATTACG
TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGAT

5

Ovr110.Q19_LCVD.aa, SEC ID N°: 22:

EIVLTQSPAIMSVYLGEKVTMTCSASLSVSYMHYQQKSSTSPKLWIYDTSKVASGVPGRFSGSGSGNSYSL
TISSMEAEDVATYYCFQGSGYPFTFGSGTKLEIKRAD

10 Ovr110.Q19_LCVD_CDR1, SEC ID N°: 23:

SASLSVSYMH

Ovr110.Q19_LCVD_CDR2, SEC ID N°: 24:

15

DTSKVAS

Ovr110.Q19_LCVD_CDR3, SEC ID N°: 25:

20 FQSGSGYPFT

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Ovr110.Q19 se muestran en SEC ID N°: 26 y 27, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 28, 29 y 30, respectivamente.

25

Ovr110.Q19_HCVD.na, SEC ID N°: 26:

GATGTACTGCTTCAGGAGTCCAGGACCTGGCCTCGTGAAAGCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGTTCTGTC
ACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATTTCTGGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCGGGAAACAACTGGAATGG
ATGGGCTACATAAGCTACGACGGTGGCAATAGCTACAACCCATCTCTCAAAAATCGAATCTCCATCACTCGT
GACACATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAGGATGAAATCTGTGACTGCTGAGGACACAGCTACATATTACTGT
GCAAGGAAGGCACTATGGTTACGCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAA
ACG

30 Ovr110.Q19_HCVD.aa, SEC ID N°: 27:

DVLLQESGPGFLVKASQSLSLTCSVTGYSITSGYFNNWIRQFFGNKLEWMGYISYDGGNSYNPSLKNRISITR
DTSKNQFFLRMKSVTAEDTATYYCARKALWLRFDYWGQGTTLTVSSAKT

Ovr110.Q19_HCVD_CDR1, SEC ID N°: 28:

35

GYSITSGYFNN

Ovr110.Q19_HCVD_CDR2, SEC ID N°: 29:

40 YISYDGGNSYNPSLKN

Ovr110.Q19_HCVD_CDR3, SEC ID N°: 30:

KALWLRFDY

45

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de Ovr110.Q23 se muestran en SEC ID N°: 31 y 32, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 33, 34 y 35, respectivamente.

50

Ovr110.Q23_LCVD.na, SEC ID N°: 31:

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTGCGCTCA
AGTACTGGGGCTGTTACAACCTAGTAAGTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCAGTGGT
CTAATAGGTGGTACCGACAACCGACCTCCAGGTGTTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAG
GCTGCCCTCACCATCACAGGGACACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTGTGGTACAGCAAC
CATTGGGTGTTCCGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCTAGGCCAGCCCAAG

5 Ovr110.Q23_LCVD.aa, SEC ID N°: 32:

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLEFTGLIGGTDNRPPGVPARFSGSLIGDK
AALTITGTQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPK

Ovr110.Q23_LCVD_CDR1, SEC ID N°: 33:

10 RSSTGAVTTSNYAN

Ovr110.Q23_LCVD_CDR2, SEC ID N°: 34:

15 LIGGTDNRPP

Ovr110.Q23_LCVD_CDR3, SEC ID N°: 35:

20 ALWYSNHWV

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Ovr110.Q23 se muestran en SEC ID N°: 36 y 37, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 38, 39 y 40, respectivamente.

25 Ovr110.Q23_HCVD.na, SEC ID N°: 36:

CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGTTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCT
ACTGGCTACACATTCAGTAGCTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATT
GGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTATTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGACCAAGGCCACATTCAGTGCA
GATACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGT
GCAAGATATTACTTCGGCAGTGTCAACTTTTACTTTGACTGCTGGGGCCAAGGTACCCTCTCACAGTCTCC
TCAGCCAAAACG

Ovr110.Q23_HCVD.aa, SEC ID N°: 37:

30 QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPBGHLEWIGEILPGSGITKYNEKFKTKATFTA
DTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYFGSVNIFYFDCWQGTTTLTVSSAKT

Ovr110.Q23_HCVD_CDR1, SEC ID N°: 38:

35 GYTFSSYWIE

Ovr110.Q23_HCVD_CDR2, SEC ID N°: 39:

40 EILPGSGITKYNEKFKT

Ovr110.Q23_HCVD_CDR3, SEC ID N°: 40:

YYFGSVNIFYFDC

45 Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de Ovr110.Q27 se muestran en SEC ID N°: 41 y 42, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 43, 44 y 45, respectivamente.

Ovr110.Q27_LCVD.na, SEC ID N°: 41:

GACATTGTGCTGACCCAGTCCCACAAAATCATGTCAACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAG
GCCAGTCAGGATGTGAGAACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAATTACTGATT
AAGTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTCTACT
TTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATAGTAATCCGACG
TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGAT

5 Ovr110.Q27_LCVD.aa, SEC ID N°: 42:

DIVLTQSHKIMSTSVGDRVSITCKASQDVRTAVAWYQOKPGQSPKLLIKSASYRYTGVDPDRFSGSGSGTDF
FTISSVQAEDLAVYYCQHYSNPTFGGGTKLEIKRAD

Ovr110.Q27_LCVD_CDR1, SEC ID N°: 43:

10 KASQDVRTAVA

Ovr110.Q27_LCVD_CDR2, SEC ID N°: 44:

15 SASYRYT

Ovr110.Q27_LCVD_CDR3, SEC ID N°: 45:

20 QHYSNPT

Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de Ovr110.Q27 se muestran en SEC ID N°: 46 y 47, respectivamente. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera se muestran en SEC ID N°: 48, 49 y 50, respectivamente.

25 Ovr110.Q27_HCVD.na, SEC ID N°: 46:

CAGGTTTCAGCCCCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCT
TCTGGCTACACCTTTACTACCTACTGGATGCAGTGGGTAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAGTGGATT
GGGGCTATTTATCCTGGAGATGGTGATACTCGGTACACTCAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCA
GATAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCTTGGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGT
GCAATTAAGTGGGGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACG

Ovr110.Q27_HCVD.aa, SEC ID N°: 47:

30 QVQPQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTTYWMQWVKORPGQGLEWIGAIYPGDGDTRYTQKFKGKATLTA
DKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCAINWGYAMDYWGQTSVTVSSAKT

Ovr110.Q27_HCVD_CDR1, SEC ID N°: 48:

35 GYTFTTYWMQ

Ovr110.Q27_HCVD_CDR2, SEC ID N°: 49:

40 AIYPGDGDTRYTQKFKG

Ovr110.Q27_HCVD_CDR3, SEC ID N°: 50:

NWGYAMDY

45 Ejemplo 2: mapeo de epítomos de MAb de Ovr110

Los epítomos reconocidos por un panel de anticuerpos de la serie Q se caracterizaron por ELISA de competición y explorando péptidos solapantes con respecto a reactividad con los anticuerpos mediante un ensayo basado en ELISA.

50

ELISA de competición

Para el ELISA de competición los MAb de serie Q se evaluaron junto con MAb anti Ovr110 A87.1 y C6.3 (descritos en los documentos PCT/US2004/014490 y PCT/US2005/040707) como controles positivos y el anticuerpo anti ricina 5 TFTB1 (ATCC, Manassas, VA) como un control negativo.

Los anticuerpos purificados se biotinilaron con Sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce, N° 21335). Se recubrieron placas con Ovr110 recombinante como se ha descrito en el protocolo de ELISA de tipo Sándwich anterior. Los pocillos se cargaron con 50 µl de anticuerpo no marcado ("anticuerpo de bloqueo") a 20 µg/ml en TBST/BSA y se incubaron 10 durante 30 minutos. Se añadió anticuerpo biotinilado 50 µl/pocillo ("anticuerpo de detección") a 2 µg/ml y las placas se incubaron durante 15 minutos. Las placas se lavaron con TBST y los pocillos se llenaron con estreptavidina-HRP 100 µl/pocillo (Pierce, N° 21126). Después de incubación de 30 minutos, las placas se lavaron con TBST y se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato de HRP 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (N° S1599; Dako Cytomation, Carpinteria, CA). La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de ácido clorhídrico 1 N. La reacción enzimática se cuantificó midiendo 15 la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 450 nm.

Cada anticuerpo se ensayó como un anticuerpo tanto de bloqueo como de detección, en todas las posibles combinaciones. Los resultados del ELISA de competición se muestran en la tabla 8 como relaciones de señal/ruido específicas, es decir cada señal en una columna dada se dividió por la señal obtenida cuando se usó el mismo 20 anticuerpo para bloqueo y detección. Se enumeran MAb de bloqueo no marcados en el eje Y con MAb de detección marcados en el eje X.

Tabla 8: emparejamiento de MAb de Ovr110 por ELISA de competición

	Q11.12.3	Q19.6	Q12.2	Q27.4	Q23.6	Q15.2	Q3.1	A87.1	C6.3
Q11.12.3	1,0	1,0	1,0	4,7	4,5	11,7	1,3	6,4	1,2
Q19.6	1,0	1,0	1,1	4,7	4,8	11,7	1,3	6,6	1,2
Q12.2	1,2	1,1	1,0	4,3	3,6	11,6	1,4	6,7	1,2
Q27.4	5,5	6,5	3,1	1,0	1,0	11,8	1,4	6,7	1,2
Q23.6	5,2	6,0	2,8	2,2	1,0	2,9	1,4	6,7	1,2
Q15.2	5,2	5,6	3,0	4,9	0,7	1,0	1,3	6,5	1,2
Q3.1	2,2	1,7	0,8	5,1	3,9	11,0	1,0	6,5	1,2
A87.1	5,0	5,2	2,8	4,8	4,4	11,1	1,3	1,0	0,1
C6.3	5,2	5,9	3,0	4,6	4,4	10,6	1,3	6,0	1,0
ricina	5,0	5,3	2,8	4,9	4,8	11,0	1,3	6,4	1,1

25 Los resultados del ELISA de competición demuestran que los MAb Q se unen con un epítipo diferente que A87.1 y C6.3. Los MAb Q11.12.3, Q12.2 y Q19.6 se unen con epítopos solapantes, ya que se bloquean entre sí. Los MAb Q23.6 y Q27.4 se unen con epítopos solapantes que son diferentes de los epítopos reconocidos por Q11.12.3, Q12.2 y Q19.6.

30 Mapeo peptídico

Se pidieron veinticuatro péptidos de SynPep (Dublín, CA). Los péptidos 1-23 fueron de 15 unidades con 5 aminoácidos solapantes con los péptidos adyacentes. El péptido 24 contenía 8 aminoácidos. Las secuencias peptídicas comenzaban en el aminoácido G21 después de la secuencia señal y terminaban en A258. Estos péptidos 35 abarcan la región extracelular de la proteína Ovr110 madura. Los péptidos se proporcionaron en alícuotas pequeñas con un intervalo de 1-3 mg disueltos en 0,2-0,5 ml de agua. Se realizó una dilución 1:400 en PBS de cada péptido y se añadieron 50 µl a cada pocillo por duplicado en placas Costar 4X de 96 pocillos (N° 3690; Costar Corporation; Cambridge, MA) y se dejaron durante una noche. Al día siguiente, las placas se secaron por sacudida y se bloquearon con TBST/BSA durante aproximadamente 1 hora. Se añadieron anticuerpos anti Ovr110 (50 µl) a 40 aproximadamente 1 µg/ml por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado de TBST. El conjugado secundario, Fc-AP de cabra anti Ig de ratón (Pierce, Rockford, IL) se diluyó 1:5000 en una solución de TBST/BSA y se añadieron 50 µl a cada pocillo. Las placas se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces antes de añadirse 50 µl de sustrato a cada pocillo y se incubaron durante 35 minutos a temperatura ambiente. El sustrato usado fue pNPP en DEA 1x (1 45 mg/ml). Para visualizar el ensayo, las placas se leyeron a 405 nm en un SpectraMaxPlus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La señal de fondo fue por debajo de 0,2 DO.

El anticuerpo Q3.1 se mapeó en el péptido 23 con una señal de 1,4 DO. Los anticuerpos Q4 y Q5 se mapearon en el péptido 13 con señales de 1,9 DO y 1,8 DO, respectivamente.

50

Los otros anticuerpos de la serie Q Q1, Q7, Q8, Q11, Q12, Q13, Q14, Q15, Q17, Q19, Q20, Q23, Q25, Q26 y Q27 no se mapearon en un péptido lo que junto con la unión demostrada con células que expresan Ovr110 anteriores indica que estos MAb se unen con epítomos conformacionales en Ovr110.

5 Ejemplo 3: unión celular de MAb de Ovr110

Para demostrar utilidad como agentes terapéuticos los anticuerpos de serie Q anti Ovr110 descritos anteriormente se evaluaron con respecto a la unión con células cancerosas que expresaban Ovr110, internalización por células cancerosas que expresaban Ovr110 y destrucción de células cancerosas que expresaban Ovr110 con un anticuerpo secundario conjugado con toxina. Todas las líneas celulares en el ejemplo posterior se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas, VA).

Unión de superficie de MAb de serie Q con células tumorales por inmunofluorescencia

Se evaluaron anticuerpos de serie Q anti Ovr110 con respecto a la capacidad para unirse con la superficie de diversas células tumorales vivas incluyendo células ZR-75-1 (cáncer de mama), células RL95.2 (cáncer endometrial), células OVCAR3 (cáncer ovárico) y células HeLa (cáncer de cuello uterino). ZR-75-1, RL95.2 y OVCAR3 son positivas para la expresión de proteína Ovr110 pero HeLa es negativa. Estas líneas celulares se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 12 mm estériles y se cultivaron a 37 °C en DMEM/FBS al 10 % durante 48 horas antes del tratamiento con los anticuerpos primarios. Se añadieron mAb de serie Q anti Ovr110 y anticuerpos de control al medio a una concentración final de 5 µg/ml y se incubaron durante una hora en hielo. Los cubreobjetos se lavaron después tres veces con PBS 1x. Después de fijación con formaldehído al 4 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS), estas células se incubaron con un anticuerpo secundario de burro anti ratón marcado con Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) a una concentración de 5 µg/ml durante 45 minutos. Después del lavado, los cubreobjetos se montaron en Vectastain (Vector, Burlingame, CA), un medio que contiene DAPI para visualizar los núcleos celulares y se observaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Thornwood, NY) equipado con los filtros fluorescentes apropiados. Se registraron microfotografías usando una cámara CCD. Ya que el receptor anti transferrina (TfnR) se localiza en la superficie celular, se usó MAb anti TfnR 5E9 de la ATCC (Manassas, VA) como un control positivo.

La Figura 1 muestra imágenes de tinción de inmunofluorescencia ejemplares de unión en superficie de células vivas de un anticuerpo anti Ovr110 con células tumorales que expresan Ovr110. Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran unión de superficie celular de mAb Ovr110.Q12.2 con células de cáncer de mama (ZR-75-1), cáncer endometrial (RL95.2) y cáncer ovárico (OVCAR3), respectivamente. No se observa tinción en células HeLa (Figura 1D) que no expresan Ovr110. La tabla 9 a continuación resume los resultados de los experimentos de unión en superficie. Los signos más indican intensidad de la tinción.

Tabla 9. Unión en superficie de anticuerpos de Ovr110 con células cancerosas vivas

mAb de Ovr110	ZR-75-1	RL95.2	OVCAR3	HeLa
Q1.2	++	++	+/-	--
Q3.1	++	+	--	--
Q11.12.3	+++	++	+	--
Q12.2	+++	++	+	--
Q15.2	+++	+++	+	--
Q19.6	++	+++	+	--
Q23.6	++	++	+	--
Q27.4	++	+	+/-	--
anti-TfnR	+	+++	++	+++
sin mAb	--	--	--	--

Los resultados en la Figura 1 y la Tabla 7 demuestran que los mAb anti Ovr110 se unen específicamente con Ovr110 nativo en la superficie de células tumorales que expresan Ovr110 y son útiles como agentes terapéuticos y de diagnóstico.

Internalización de MAb de serie Q por células tumorales vivas

Se marcaron mAb purificados con Alexa Fluor 488 (Molecular Probe, Eugene, OR) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las siguientes líneas celulares de cáncer se usaron en este estudio: ZR-75-1 (cáncer de mama), SKBR3 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer de cuello uterino). Las transferencias de Western confirmaron que las células ZR-75-1 y SKBR3 expresan proteína Ovr110 y las células HeLa no. Las células se sembraron en cubreobjetos durante dos días para dejar que las células se unieran completamente. Después se añadieron mAb

marcados con Alexa-488 a las células vivas a 5 µg/ml durante 24 horas a 37 grados en incubador con CO₂ al 5 %. Las células se lavaron después tres veces con PBS 1x. La tinción en superficie de los mAb se interrumpió incubando las células con anticuerpo de conejo anti Alexa 488 10 µg/ml (Molecular Probe, Eugene, OR) en hielo durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBS 1x, las células se fijaron con formaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el formaldehído residual lavando las células una vez con PBS 1x. Los cubreobjetos se montaron después en Vectastain (Vector, Burlingame, CA), un medio que contiene DAPI para visualizar los núcleos celulares, y se observó en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (Cari Zeiss, Thornwood, NY) equipado con los filtros fluorescentes apropiados. Se registraron microfotografías usando una cámara CCD. Ya que el receptor de transferrina (TfnR) se localiza en la superficie celular y puede internalizarse, se usó MAb anti TfnR 5E9 de la ATCC (Manassas, VA) como un control positivo. La ricina no se expresa en células de mamífero y no se localiza en la superficie celular, por lo tanto se usó el MAb anti ricina TFTB1 (ATCC, Manassas, VA) como un control negativo.

La Figura 2 muestra imágenes de inmunofluorescencia ejemplares de la internalización de un anticuerpo anti Ovr110 por células tumorales vivas que expresan Ovr110. Las Figuras 2A y 2B muestran respectivamente la internalización de mAb Ovr110.Q11.12.3 en células tumorales de mama ZR-75-1 y SKBR3. No se observó internalización en células HeLa (Figura 2C) que no expresan Ovr110. La tabla 10 a continuación resume los resultados de los experimentos de internalización. Los signos más (+) indican la intensidad de la tinción en la célula lo que indica internalización, n/d indica que no se observó internalización.

Tabla 10.

Ab de Ovr110 marcados con Alexa488	Internalización en ZR-75-1	Internalización en SKBR3	Internalización en HeLa
Anti ricina	--	--	--
Anti-TfnR	+++	+++	+++
Q1.2	n/d	n/d	n/d
Q3.1	n/d	n/d	n/d
Q11.12.3	+++	+++	--
Q12.2	+	+	--
Q15.2	n/d	n/d	n/d
Q19.6	++	++	--
Q23.6	++	++	--
Q27.4	+/-	+/-	--

Los resultados en la Figura 2 y la Tabla 10 demuestran que los mAb anti Ovr110 se internalizan de forma inesperada por células cancerosas que expresan Ovr110 vivas y son útiles como agentes terapéuticos.

Destrucción de células tumorales por MAb de serie Q y conjugado con saporina de MAb-ZAP

Se sembraron células tumorales de ZR-75-1 (cáncer de mama), SKBR3 (cáncer de mama) y HCT116 (cáncer de colon negativo para Ovr110) a 3000, 3000 y 1500 células/pocillo respectivamente en placas de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran durante una noche. Se añadieron anticuerpos monoclonales a células vivas a 0,4 y 2,0 µg/ml al día siguiente (día 0) con o sin 1 µg/ml del conjugado de saporina de Ig anti ratón de cabra mAb-ZAP de Advanced Targeting Systems (San Diego, CA). mAb-ZAP, tras su internalización, libera saporina lo que destruye las células. Ya que el receptor de transferrina (TfnR) está localizado en la superficie celular y puede internalizarse, se usó MAb anti TfnR 5E9 de la ATCC (Manassas, VA) como un MAb de control positivo. La ricina no se localiza en la superficie celular, por lo tanto se usó el MAb anti ricina TFTB1 (ATCC, Manassas, VA) como un control negativo para destrucción. El día 5, la viabilidad celular se midió usando el ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiterGlo de Promega (Madison, WI).

Los resultados se presentan en las Tablas 11a, 11b y 11c a continuación como un porcentaje del crecimiento de células tratadas con MAb + MAb-ZAP en comparación con células no tratadas. El porcentaje de crecimiento celular se calculó normalizando la unidad de luminiscencia de las muestras frente a medio solamente (100 %) en cada placa.

Tabla 11a. Destrucción de células ZR-75-1 por MAb de Ovr110 de serie Q y conjugado de saporina de MAb-ZAP

Porcentaje de crecimiento en comparación con pocillos con medio solamente				
MAb solamente		MAb con mAb-ZAP 1,0 µg/ml		
Clon de MAb	MAb (0,4 µg/ml)	MAb (2,0 µg/ml)	MAb (0,4 µg/ml)	MAb (2,0 µg/ml)
Anti ricina	107,1 %	104,9 %	92,3 %	95,4 %

	Porcentaje de crecimiento en comparación con pocillos con medio solamente			
	MAb solamente		MAb con mAb-ZAP 1,0 µg/ml	
Clon de MAb	MAb (0,4 µg/ml)	MAb (2,0 µg/ml)	MAb (0,4 µg/ml)	MAb (2,0 µg/ml)
anti-TfnR	104,8 %	116,5 %	35,0 %	49,3 %
Q1.2	106,0 %	99,2 %	85,8 %	83,9 %
Q3.1	97,6 %	103,0 %	103,6 %	104,2 %
Q11.12.3	108,6 %	112,8 %	31,5 %	44,3 %
Q12.2	113,1 %	102,3 %	38,0 %	67,7 %
Q15.2	95,3 %	98,6 %	45,6 %	57,8 %
Q19.6	99,1 %	99,6 %	28,1 %	46,5 %
Q23.6	102,4 %	97,2 %	37,5 %	45,5 %
Q27.4	101,3 %	98,3 %	60,6 %	69,5 %

Tabla 11b. Destrucción de células SKBR3 por MAb de Ovr110 de serie Q y conjugado de saporina de MAb-ZAP

	Porcentaje de crecimiento en comparación con pocillos con medio solamente			
	MAb solamente		MAb con mAb-ZAP 1,0 µg/ml	
Clon de MAb	MAb (0,4 µg/ml)	MAb (2,0 µg/ml)	MAb (0,4 µg/ml)	MAb (2,0 µg/ml)
Anti ricina	96,6 %	102,2 %	82,7 %	86,6 %
anti-TfnR	93,9 %	94,35	18,4 %	44,6 %
Q1.2	n/d	n/d	n/d	n/d
Q3.1	n/d	n/d	n/d	n/d
Q11.12.3	98,2 %	95,3 %	32,7 %	47,7 %
Q12.2	95,2 %	100,7 %	58,5 %	68,4 %
Q15.2	93,3 %	100,9 %	67,8 %	81,7 %
Q19.6	97,6 %	97,4 %	49,8 %	25,0 %
Q23.6	98,8 %	101,2 %	68,9 %	73,6 %
Q27.4	98,9 %	101,2 %	68,9 %	73,6 %

Tabla 11c. Destrucción de células HCT116 por MAb de Ovr110 de serie Q y conjugado de saporina de MAb-ZAP

	Porcentaje de crecimiento en comparación con pocillos con medio solamente			
	MAb solamente		MAb con mAb-ZAP 1,0 µg/ml	
Clon de MAb	MAb (0,4 µg/ml)	MAb (2,0 µg/ml)	MAb (0,4 µg/ml)	MAb (2,0 µg/ml)
Anti ricina	98,3 %	97,4 %	97,4 %	99,1 %
anti-TfnR	103,0 %	109,4 %	10,0 %	24,9 %
Q1.2	n/d	n/d	n/d	n/d
Q3.1	n/d	n/d	n/d	n/d
Q11.12.3	102,6 %	100,7 %	106,7 %	101,9 %
Q12.2	104,3 %	104,7 %	101,4 %	102,5 %
Q15.2	105,8 %	102,2 %	103,7 %	104,0 %
Q19.6	97,9 %	101,8 %	100,1 %	102,2 %
Q23.6	99,4 %	101,0 %	98,3 %	99,4 %
Q27.4	97,2 %	97,5 %	99,0 %	99,8 %

5

Los resultados en las Tablas 11a, 11b y 11c demuestran que los MAb anti Ovr110 se unen específicamente con, se internalizan y destruyen células cancerosas que expresan Ovr110 vivas junto con una toxina internalizada. La toxina puede internalizarse mediante conjugación con un anticuerpo secundario, o mediante conjugación directa con el anticuerpo anti Ovr110 primario. Los anticuerpos anti Ovr110 de serie Q son útiles como agentes terapéuticos para

10

Ejemplo 4: eficacia terapéutica de MAb de Ovr110

Se evaluaron anticuerpos monoclonales anti Ovr110 con respecto a eficacia antitumoral terapéutica contra tumores que expresan Ovr110. Los MAb se ensayaron como agentes individuales y en combinación con un compuesto antitumoral de moléculas pequeñas conocido en un modelo tumoral humano.

15

Xenoinjerto ortotópico de ZR-75-1

La inmunohistoquímica previa de los inventores y estudios de inmunotransferencia de Western demostraron expresión de alto nivel de Ovr110 en el tumor ZR-75-1. Por lo tanto, el modelo de xenoinjerto ortotópico de tumor de mama humano ZE-75-1 con paclitaxel como el compuesto de control positivo se usó para evaluar la eficacia de MAb de Ovr110. El paclitaxel es una molécula pequeña farmacológica que se sabe que tiene eficacia contra tumores ginecológicos incluyendo tumores de mama y ováricos. La eficacia antitumoral del anticuerpo anti Ovr110 se evaluó determinando la inhibición del crecimiento tumoral en el estudio (TGI) y el aumento general de la supervivencia del sujeto por regímenes de tratamiento de agente individual y de combinación.

Materiales y métodos

Los anticuerpos monoclonales Ovr110.C6.3.2.1.2 y Ovr110.Q19.6 se han descrito anteriormente y previamente en los documentos PCT/US2004/014490 y PCT/US2005/040707. Los MAb se purificaron a partir del sobrenadante de hibridomas clonales y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Se recibió paclitaxel (Lote N° R026849) de Infusions Solutions, Inc. (Bedford, NH), se almacenó a temperatura ambiente y se diluyó en solución salina hasta concentraciones de trabajo finales (0,5 mg/ml).

La línea celular tumoral ZR-75-1 se obtuvo de ATCC (Manassas, VA) y se usó para los estudios de xenoinjerto después de eliminación por el Ensayo de Amplificación por PCR de Microbios Infecciosos (IMPACT), un panel de ensayos de PCR que detectan patógenos murinos en muestras biológicas. Los cultivos se mantuvieron en RPMI1640 complementado con suero bovino fetal al 15 %, y atmósfera de CO₂ al 5 %. Los cultivos se expandieron a una relación de división de 1:5 en matraces de cultivo tisular T225 hasta que pudo recogerse un número apropiado de células para inoculación.

Se proporcionaron ratones ICR SCID, IcrTac:ICR-*Prkdc*^{scid} por Taconic (Hudson, NY). Los ratones se recibieron a las cinco a seis semanas de edad y se aclimataron durante cuatro días antes de la manipulación. Los animales se alojaron en un ambiente sin amoníaco en jaulas aisladas individualmente. Todos los procedimientos se llevaron a cabo según las directrices institucionales del Comité de Cuidado y Uso Animal Institucional de Servicios de Desarrollo de Fármacos de TGen (Protocolo N° 06002, Aprobado en marzo de 2006).

Xenoinjertos

Se inoculó a cada ratón por vía ortotópica en la almohadilla de grasa mamaria N° 4 0,1 ml de una suspensión celular de 50 % de medio/50 % de Matrigel que contenía células tumorales ZR-75-1 (1,0 x 10⁷ células/ratón).

Veinticuatro días después de la inoculación, los tumores se midieron y se calculó el peso tumoral usando la fórmula: peso tumoral (mg) = (a x b²)/2 en la que "b" es el diámetro más pequeño y "a" es el diámetro mayor. Una vez que los tumores establecidos alcanzaron aproximadamente 71 mg, los ratones se emparejaron en los diversos grupos de tratamiento y de control (Día 1) (n=10). El Día 1, se administraron Ovr110.C6.3.2.1.2 (100 mg/kg), Ovr110.Q19.6 (100 mg/kg) y paclitaxel (5 mg/kg) por vía intraperitoneal como agentes individuales o en combinación. El régimen de dosificación para los anticuerpos monoclonales fue de 2 veces por semana durante 4 semanas. Se administró paclitaxel los Días 1-5. Comenzando el Día 1, los pesos corporales de los ratones y las mediciones de los tumores se controlaron dos veces por semana. Cuando los tumores individuales de cada ratón alcanzaron un punto final aproximado de 1000 mg, el ratón se sacrificó por asfixia con CO₂ regulado.

Evaluación de datos y métodos estadísticos

Se calculó la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) utilizando la siguiente fórmula, en la que X es igual al peso tumoral:

$$TGI = \left[1 - \frac{(\bar{X}_{\text{Tratados(Final)}} - \bar{X}_{\text{Tratados(Día 1)}})}{(\bar{X}_{\text{Control(Final)}} - \bar{X}_{\text{Control(Día 1)}})} \right] \times 100\%$$

Los tumores que tuvieron regresión desde el tamaño de partida del Día 1 se retiraron de la media de Día 1 y Día Final del grupo, y se calcularon nuevas medias para el grupo respectivo antes de la TGI calculada. Se calculó la contracción tumoral individual (TS) usando la fórmula posterior para tumores que mostraron regresión en relación con el peso tumoral del Día 1. La contracción tumoral media de cada grupo se calcula y se presenta.

$$TS = \left[1 - \frac{(\text{Peso Tumoral}_{(\text{Final})})}{(\text{Peso Tumoral}_{(\text{Día 1})})} \right] \times 100\%$$

5 Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism® v4. Las fracciones de supervivencia se calcularon usando el método de Kaplan-Meier. Se compararon curvas de supervivencia usando el ensayo de rasgos logarítmicos y se calculó y se presentó la mediana de la supervivencia. Se completaron análisis de pesos tumorales relativos por ANOVA utilizando el Post ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett.

Resultados

10 Los anticuerpos tanto Ovr110.C6.3.2.1.2 como Ovr110.Q19.6 se toleraron bien y no se observó toxicidad manifiesta.

Se evaluó la eficacia determinando la inhibición del crecimiento tumoral en el estudio (TGI) y el aumento general de la supervivencia de los regímenes de tratamiento de agente individual y combinación. Se determinó la TGI el Día 23, el día final en el que todos los animales aún permanecían en sus grupos respectivos. Los resultados se resumen en la Tabla 12 posterior.

20 Los anticuerpos monoclonales Ovr110.C6.3.2.1.2 y Ovr110.Q19.6 administrados como agentes individuales inhibieron el crecimiento tumoral en 39,1 % y 39,7 %, respectivamente. El tratamiento con agentes individuales Ovr110.C6.3.2.1.2 y Ovr110.Q19.6 dio como resultado una reducción significativa del peso tumoral relativo en comparación con control de vehículo. Los regímenes de tratamiento de los mAb como agentes individuales mostraron un aumento de la duración de la supervivencia en relación con el control de vehículo. El tratamiento con un único agente de paclitaxel no fue significativamente superior a tratamientos con un único agente de Ovr110.C6.3.2.1.2 y Ovr110.Q19.6 con respecto a inhibición del crecimiento tumoral, pero sí mostró un aumento similar en la supervivencia en relación con el control de vehículo.

25 Los regímenes de tratamiento de Ovr110.C6.3.2.1.2 u Ovr110.Q19.6 con paclitaxel dieron como resultado pesos tumorales medios significativamente menores en comparación con control de vehículo. Ovr110.C6.3.2.1.2 en combinación con paclitaxel (TGI = 40,6 %) mostró eficacia en la reducción del crecimiento tumoral. La combinación de Ovr110.Q19.6 y paclitaxel potencian significativamente la eficacia en comparación con cada uno de los constituyentes individuales de la combinación (TGI = 65,4 %).

Tabla 12. Eficacia de MAb de Ovr110 frente a tumor humano

Grupo de Tratamiento	Nº de Ratones	Dosis (mg/kg)	Programa de Administración IP	Peso Tumoral del Grupo	% de TGI el día 23	Peso tumoral relativo p valor frente a control	Mediana de la supervivencia (días)	Muertes
Control de Vehículo	10	--	2x semanalmente x 4	748,6 ± 53,2	--	--	28	0
C6	10	100	2x semanalmente x 4	483,7 ± 36,2	39,1	P<0,01	31,5	0
Q19	10	100	2x semanalmente x 4	479,7 ± 39,7	39,7	P<0,01	33	0
Pac	10	5	QD x 5	461,5 ± 45,8	42,3	P<0,01	35	0
C6 Pac	10	100 5	2x semanalmente x 4 QD x 5	473,5 ± 42,9	40,6	P<0,01	30	0
Q19 Pac	10	100 5	2x semanalmente x 4 QD x 5	305,8 ± 25,6	65,4	P<0,01	37	0

Nota: Ovr110.C6.3.2.1.2 = C6, Ovr110 Q19.6 = Q19, Paclitaxel = Pac

35 En general, se observó actividad antitumoral pronto en los grupos de tratamiento con anticuerpo Ovr110.C6.3.2.1.2, y Ovr110.Q19.6 como agentes individuales con eficacia estadísticamente significativa observada en comparación con control de vehículo. La combinación de cada anticuerpo con paclitaxel mantuvo la significación sobre el control. La combinación de Ovr110.Q19.6 y paclitaxel dio como resultado pesos tumorales significativamente menores en comparación con agentes individuales Ovr110.Q19.6 y paclitaxel lo que sugiere interacciones aditivas. Aunque no se midió un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia, hubo una tendencia. También se observó aumento de la mediana de la supervivencia para sujetos tratados con anticuerpo.

Estudio 2 de xenoinjerto ortotópico de ZR-75-1

Se usó un segundo estudio del modelo de xenoinjerto ortotópico de tumor de mama humano ZR-75-1 con paclitaxel como el compuesto de control positivo para evaluar la eficacia de MAb de Ovr110 y dosificación. Los anticuerpos de Ovr110 evaluados incluyen Ovr110.C6.3.2.1.2, Ovr110.Q19.6, Ovr110.Q11.12.3, Ovr110.Q12.2 y Ovr110.Q27.4. El estudio y la evaluación se realizaron como se ha descrito anteriormente con los siguientes cambios. El número de ratones en cada grupo fue de 8, y solo se determinó inhibición del crecimiento tumoral el día 15 y el día 35. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 13.

10 Tabla 13. Eficacia del MAb de Ovr110 contra Tumor Humano

Grupo de Tratamiento	Nº de Ratones	Dosis (mg/kg)	Programa de Administración IP	% de TGI el día 15	% de TGI el día 35
Control de Vehículo	8	—	2x semanalmente x 4	—	—
C6	8	50	2x semanalmente x 4	46,3	10
Q19	8	50	2x semanalmente x 4	69	24,1
Q19	8	100	2x semanalmente x 4	78,5	35
Q11	8	50	2x semanalmente x 4	53,3	24,1
Q12	8	50	2x semanalmente x 4	57	39
Q27	8	50	2x semanalmente x 4	31,4	15,5
Pac	8	5	QDx5	55,3	15,8

Nota: Ovr110.C6.3.2.1.2 = C6, Ovr110.Q19.6 = Q19, Ovr110.Q11.12.3 = Q11, Ovr110.Q12.2 = Q12, Ovr110.Q27.4 = Q27, Paclitaxel = Pac

Como se ha demostrado anteriormente, se observó actividad antitumoral con grupos de tratamiento de anticuerpo Ovr110.C6.3.2.1.2 y Ovr110.Q19.6. Ovr110.Q19.6 también demostró actividad antitumoral a media dosis de 50 mg/kg lo que indica alta eficacia de Ovr110.Q19.6 y anticuerpos que se unen con el mismo epítopo que Ovr110.Q19.6. Adicionalmente, Ovr110.Q11.12.3, Ovr110.Q12.2 y Ovr110.Q27.4 demostraron actividad antitumoral en sus grupos de tratamiento respectivos.

20 Conclusiones de la eficacia antitumoral del anticuerpo de Ovr110

Los resultados de los modelos de xenoinjerto de ratón anteriores demuestran que los anticuerpos anti Ovr110 son útiles como agentes terapéuticos contra tumores humanos en mamíferos. Específicamente, los anticuerpos anti Ovr110 administrados a mamíferos con tumores humanos demostraron reducción en el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo, reducción en el peso tumoral a lo largo del tiempo y aumento del tiempo de supervivencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> di aDexus, Inc.
Papkoﬀ, Jackie
Diedrich, Gundo
Liu, Shu-Hui.
Nowakowski , Agnes
- 35 <120> Composiciones de Anticuerpos de OVR110 y Métodos de Uso
- <130> DEX0598WO
- <150> US 60/861.657
- 40 <151> 27-11-2006
- <160> 52
- <170> PatentIn versión 3.4
- 45 <210> 1
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Sintética

<400> 1

gaaaatgttc t caccagtc t ccagcaat c atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60
atgacctgt a gtgccagct c aagtgt aagt t acatgcact ggtaccagca gaagtcaagc 120
acctccccca aactctggat t tatgacaca tccaaactgg ctctctggagt cccaggtcgc 180
ttcagtgcca gtgggtctgg aaactcctac tctctcacga tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgttgcca cttattactg ttttcagggg agtgggtacc cattcacgtt cggctcgggg 300
acaaagt tgg aaataaaacg ggctgat 327

5

<210> 2
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

<400> 2

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Oys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

15

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Oys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
100 105

20

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Sintética

<400> 3

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

30

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 4

5 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

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

<220>
<223> Sintética

15 <400> 5

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

20 <210> 6
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintética

<400> 6

gatgtacagc ttccaggagtc aggacctggc ctctgtgaaac ctctcagtc tctgtctctc 60
acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtggttatt tctggagctg gatccggcag 120
tttccaggaa acaaaactgga atggatgggc ttcatagct acgacggtag caatagctac 180
aaccocatctc tcaaaaatcg gatctccatt actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc 240
ctgaggttga attctgtgac taaagaggac acagctacat attactgtgc caggaagtta 300
ctatggctac gctttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcaagictctc ctgagccaaa 360
acg 363

<210> 7
<211> 121
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

40 <400> 7

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

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 8

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Phe Trp Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 9

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

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

<220>
<223> Sintética

<400> 10

Lys Leu Leu Trp Leu Arg Phe Asp Tyr
1 5

5

<210> 11
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

<400> 11

caaat t g t t c t c a c c c a g t c t c c a g c a a t c a t g t c t g c a t c t c c a g g g g a g a a g g t c a c c 60
a t g a c c t g c a g t g c c a g c t c a g g t a t a a g t t a c a t g c a c t g g t a c c a g c a g a a g c c a g g c 120
a c c a c c c c c a a a a g a t g g a t t t a t g a c g c a t c c a a a c t g g c t t c t g g a g t c c c t t c t c g c 180
t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g g a c c t c t t a t t c t c t c a c a a t c a g c a g c a t g g a g g c t g a a 240
g a t g c t g c c a c t t a t t a c t g c c a t c a g c g g c g t a g t t a c c c a t t c a c g t t c g g c t c g g g g 300
a c a a a g t t g g a a a t a a a a c g g g c t g a t 327

15

<210> 12
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Sintética

25

<400> 12

G n I l e V a l L e u T h r G n S e r P r o A l a I l e M e t S e r A l a S e r P r o G l y
1 5 10 15
G u L y s V a l T h r M e t T h r C y s S e r A l a S e r S e r G l y I l e S e r T y r M e t
20 25 30
H i s T r p T y r G n G n L y s P r o G l y T h r T h r P r o L y s A r g T r p I l e T y r
35 40 45
A s p A l a S e r L y s L e u A l a S e r G l y V a l P r o S e r A r g P h e S e r G l y S e r
50 55 60
G l y S e r G l y T h r S e r T y r S e r L e u T h r I l e S e r S e r M e t G u A l a G u
65 70 75 80
A s p A l a A l a T h r T y r T y r C y s H i s G n A r g A r g S e r T y r P r o P h e T h r
85 90 95
P h e G l y S e r G l y T h r L y s L e u G u I l e L y s A r g A l a A s p
100 105

30

<210> 13
<211> 10
<212> PRT

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
5	<400> 13	
	Ser Ala Ser Ser Gly Ile Ser Tyr Met His	
	1 5 10	
10	<210> 14	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 14	
	Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser	
20	1 5	
	<210> 15	
	<211> 9	
	<212> PRT	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
30	<400> 15	
	His Gln Arg Arg Ser Tyr Pro Phe Thr	
	1 5	
35	<210> 16	
	<211> 366	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<2'20>	
	<223> Sintética	
40	<400> 16	
	cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ct tgt gaagc ct ggggct ac agt gaagct g 60	
	t cct gcaaga ct t ct ggct a caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120	
	cctggacaag gcct t gagi g gat cggagag at t gat cct t ct gat agt t a t act aact ac 180	
	aatcaaaagt tcaagggcaa ggccacat t g act gt agaca cat cct ccac cacagcct ac 240	
	atgcagct ca gcagcct gac at ct gaagac tct ggggt ct at t act gt gc aagagagt at 300	
	ggtaacaacg at gct at gga ct act ggggt caaggaacct cagt caccgt ct cct cagcc 360	
	aaaacg 366	
45	<210> 17	
	<211> 122	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50		

<220>

<223> Sintética

<400> 17

5

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

<210> 18

<211> 10

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

15

<400> 18

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

20

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Sintética

<400> 19

Gu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn G n Lys Phe Lys
1 5 10 15

30

Gly

5	<210> 20	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 20	
	G u Tyr G y Asn Asn Asp Al a Met Asp Tyr	
	1 5 10	
15	<210> 21	
	<211> 327	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 21	
	gaaat t gt t c t caccagc t c t ccagcaat c at gt ct gt at at ct agggga aaaggt cacc	60
	at gacct gca gt gccagct t aagt gt t agt t acat gcact ggt accagca gaagt caagc	120
	acct ccccca aact ct ggat t t at gacaca t ccaaagt gg ct t ct ggagt cccaggt cgc	180
	t t cagt ggca gt ggggt ct gg aaact ct t at t ct ct cacga t cagcagcat ggaggct gaa	240
	gat gt t gcc a ct t att act g t t t t cagggg agt ggggt acc cat t cacgt t cggct cgggg	300
	acaaagt t gg aaat aaaacg ggct gat	327
25	<210> 22	
	<211> 109	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 22	
	G u l l e Val Leu Thr G n Ser Pro Al a l l e Met Ser Val Tyr Leu G y	
	1 5 10 15	
35	G u Lys Val Thr Met Thr Oys Ser Al a Ser Leu Ser Val Ser Tyr Met	
	20 25 30	

ES 2 543 350 T3

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

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética
 <400> 23

Ser Ala Ser Leu Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética
 <400> 24

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 1 5

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

<220>
 <223> Sintética
 <400> 25

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 26

gatgtactgc tt caggagt c aggacctggc ct cgt gaaag ct tct cagt c tct gt ct ct c 60
acctgttctg t cactggcta ct ccat cacc agtgggtatt tct ggaact g gat ccggcag 120
tttccgggaa acaaactgga atggatgggc t acat aagct acgacggt gg caat agct ac 180
aaccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaaaga ccagtttttc 240
ctgaggatga aatctgtgac t gctgaggac acagctacat attactgtgc aaggaaggca 300
ctatggttac gctttgattat tggggccag ggcaccactc t cacagtctc ct cagccaaa 360
acg 363

<210> 27

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 27

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

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 28

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Phe Trp Asn
1 5 10

5 <210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 29

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asn Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

15 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25 <400> 30

Lys Ala Leu Trp Leu Arg Phe Asp Tyr
1 5

30 <210> 31
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

<400> 31

caggctgttg t gact cagga at ct gcact c accacat cac ct ggt gaaac agt cacact c 60
act t gt cgct caagt act gg ggct gt t aca act agt aact at gccaaact g ggt ccaagaa 120
aaaccagat c att t at t cac t ggt ct aat a ggt ggt accg acaaccgacc t ccaggt gt t 180
cct gccagat t ct caggct c cct gal t gga gacaaggct g ccc caccat cacagggaca 240
cagact gagg at gaggcaat at at t t ct gt gct ct gt ggt acagcaacca t t gggt gt t c 300
ggg ggaggaa ccaaact gac t gt cct aggc cagcccaag 339

40 <210> 32
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintética

<400> 32

50

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

Lys

5 <210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 33

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

15 <210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 34

25 Leu Ile Gly Gly Thr Asp Asn Arg Pro Pro
1 5 10

30 <210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

<400> 35

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
1 5

5

<210> 36
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintética

<400> 36

```
caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ttgatgaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt agctactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gat tggagag attttacctg gaagtggat t actaagtac 180
aatgagaagt tcaagaccaa ggccacattc actgcagat a catcctccaa cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagatattac 300
ttcggcagtg tcaactttta ctttgactgc tggggccaag gtaccactct cacagtctcc 360
tcagccaaaa cg 372
```

15

<210> 37
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Sintética

25

<400> 37

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

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 38

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 39

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Thr

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

<220>

<223> Sintética

<400> 40

Tyr Tyr Phe Gly Ser Val Asn Phe Tyr Phe Asp Gys.
1 5 10

<210> 41

<211> 327

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 41

gacattgtgc t gacccagt c ccacaaaat c atgt caacat cagt aggaga cagggt cagc 60
atcacctgca aggccagt ca ggatgtgaga actgctgt ag cctggat ca acagaaacca 120
ggacaatctc ct aaattact gatt aagtcg gcat cctacc ggtacactgg agtccctgat 180
cgcttcagtg gcagtggtat tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta atccgacgtt cggtggaggc 300
accaagctgg aaatcaaacg ggctgat 327

<210> 42

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>- Sintética

<400> 42

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Asn Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp
100 105

5 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética

 10 <400> 43

 Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Thr Ala Val Ala
 1 5 10

 15 <210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial -

 <220>
 <223> Sintética
 20 <400> 44

 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

 25 <210> 45
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Sintética

 <400> 45

 Gln Gln His Tyr Ser Asn Pro Thr
 1 5
 35

 40 <210> 46
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>-
 <223> Sintética
 45 <400> 46

 cagggttcagc cccagcagtc tggggctgag ctggcaagac ctggggcttc agtgaagttg 60
 tccctgcaagg cttctggcta cacccttact acctactgga tgcagtggtg aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggagtg gatggggct atttatcctg gagatggtga tactcggtag 180
 actcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagat aaatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcttggc atctgaggac tctgcggctct attactgtgc aattaaactgg 300
 ggctatgcta tggactactg ggggcaagga acctcagtc aacgtctcctc agccaaaacg 360

 <210> 47

<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintética

<400> 47

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

10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

20 <400> 48

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Gln
1 5 10

25 <210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 49

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 50

Asn Trp Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 51

<211> 290

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 51

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile
1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
20 25 30

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

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

<210> 52
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 52

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

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

Ala Ser Thr Oys Pro Pro Oys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
275 280 285

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
290 295 300

Arg Thr Pro Glu Val Thr Oys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
305 310 315 320

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
325 330 335

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
340 345 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
355 360 365

Tyr Lys Oys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
405 410 415

Oys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430

Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
485 490 495

Lys

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti Ovr110 o fragmento de unión a antígeno que comprende:
 - 5 (a) una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 7;
 - (b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 12 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 17;
 - 10 (c) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 22 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 27; o
 - (d) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 42 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 47.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
3. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que inhibe la función de Ovr110, en donde la función de Ovr110 es la supresión de la respuesta inmunitaria contra células que expresan Ovr110, en el que la supresión de Ovr110 de la respuesta inmunitaria es mediante regulación de linfocitos.
4. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la regulación de linfocitos se selecciona del grupo que consiste en activación de linfocitos T, activación de linfocitos B, activación de células NK, proliferación de células T, proliferación de células B, proliferación de células NK, infiltración tumoral de células T, infiltración tumoral de células B e infiltración tumoral de células NK.
5. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente conjugado con un agente citotóxico.
6. Una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, unida a una segunda porción funcional que tiene una especificidad de unión diferente de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.
7. Una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 5 o una molécula biespecífica de acuerdo con la reivindicación 6, y un portador farmacéuticamente aceptable.
8. Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende:
 - (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 11, 21 y 41; y
 - (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 6, 16, 26 y 46.
10. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9.
11. Una célula hospedadora que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Un ratón transgénico que comprende transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana, en el que el ratón expresa el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
13. Un hibridoma preparado a partir de un ratón de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el hibridoma produce el anticuerpo.
14. Una célula que produce un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
15. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa Ovr110.
16. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el cáncer se selecciona de cáncer del tracto urinario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon,

cáncer pancreático y cáncer ovárico.

17. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en la inhibición de la supresión de una respuesta inmunitaria contra una célula tumoral que expresa Ovr110.

18. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la respuesta inmunitaria se selecciona de la activación de células T, activación de células B, activación de células NK, proliferación de células T, proliferación de células B, proliferación de células NK, infiltración tumoral de células T, infiltración tumoral de células B e infiltración tumoral de células NK.

19. Un método *in vitro* para detectar la sobreexpresión de Ovr110 en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en condiciones adecuadas para la unión;
- (b) determinar el nivel de Ovr110 en la muestra; y
- (c) comparar el nivel de Ovr110 en la muestra con el nivel de Ovr110 en un intervalo de control o normal;

en donde un aumento en el nivel de Ovr110 en la muestra del sujeto en comparación con el intervalo de control o normal es indicativo de la sobreexpresión de Ovr110.

20. Un método de acuerdo con la reivindicación 19 en el que la muestra se selecciona de sangre, suero, plasma, líquido ascítico, orina, lavado peritoneal y tejido.

21. Un método de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20 en el que el sujeto tiene cáncer seleccionado de cáncer ovárico, uterino, de riñón, pancreático, de pulmón, de mama y de cabeza y cuello.

1 / 2

Fig 1B.
Cáncer
endometrial

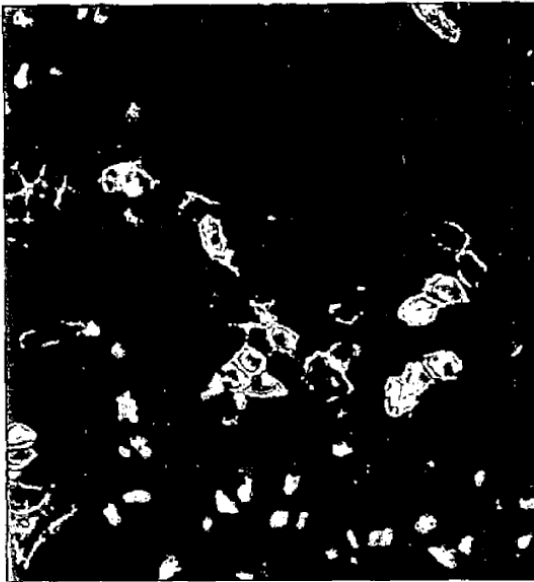


Fig 1D.
Control
negativo



Fig 1A.
Cáncer
de mama



Fig 1C.
Cáncer
ovárico



2 / 2

