

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 621 874**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2011 PCT/US2011/030025**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11119979**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11760326 (6)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2552959**

(54) Título: **Anticuerpos para MUC16 y métodos de uso de los mismos**

(30) Prioridad:

26.03.2010 US 317964 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2017

(73) Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US**

(72) Inventor/es:

**SPRIGGS, DAVID y
THAPI, DHARMARAO**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 621 874 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para MUC16 y métodos de uso de los mismos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a un polipéptido, o parte antigénica del mismo, en el que el polipéptido se selecciona de a) polipéptido de ectodomio de MUC16, b) polipéptido de dominio citoplasmático de MUC16 y c) polipéptido de dominio extracelular de MUC16 que contiene un polipéptido de bucle de cisteína. Los anticuerpos de la invención y composiciones que los contienen son útiles en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas para enfermedades en las que MUC16 está sobreexpresado, tales como cáncer.

15 **Antecedentes de la invención**

En el diagnóstico de varios cánceres se usan marcadores de superficie celular y antígenos desprendidos. Por ejemplo, el antígeno CA125, reconocido por el anticuerpo OC125, es un antígeno en circulación, específico de tejido expresado en cáncer ovárico. El antígeno CA125 está codificado por el gen de MUC16, clonado por Lloyd y Yin. El gen de longitud completa describe una proteína mucina unida a complejo presente principalmente en diversos tejidos ginecológicos, especialmente neoplasias. OC125 y otros anticuerpos relacionados reaccionan con antígenos dependientes de glucosilación presentes exclusivamente en la parte escindida de la molécula.

Un ensayo de suero puede detectar niveles elevados del antígeno CA125 en circulación en muchos pacientes con cáncer ovárico epitelial, y este antígeno, derivado usando la línea celular ovárica OVCA433, es reconocido por el anticuerpo OC125 (1-2). La detección de CA125 en circulación en suero ha demostrado ser una herramienta útil para el control de los pacientes con cáncer ovárico y ensayos clínicos (3-4). Sin embargo, CA125 no es suficientemente sensible ni específico para exploración de cáncer general (5-6). Se ha definido posteriormente diversos anticuerpos unidos a CA125 incluyendo VK8 y M11 como presentes en células de cáncer ovárico (7-9). Aunque estos anticuerpos se han usado para desarrollar ensayos en suero y diversos otros estudios en cáncer ovárico, tienen defectos significativos para uso clínico en la exploración o suministro tisular. Estos anticuerpos no son útiles como herramientas de exploración, ni pueden detectar el fragmento proteico de MUC16 residual próximo después de la escisión. Esto ha limitado sus aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

Por ejemplo, OC125, M11, y la mayoría de otros anticuerpos preparados contra extractos celulares de cáncer ovárico se dirigen a antígenos complejos, dependientes de glucosilación. Estos antígenos están exclusivamente presentes en la parte desprendida de MUC16 y no pueden emplearse para seguir la biología de la parte próxima de MUC16 y pueden no reflejar con precisión la distribución tisular ya que los patrones de glucosilación pueden variar sustancialmente entre tejidos. Debido a que la amplia mayoría de anticuerpos reactivos para MUC16, incluyendo OC125, reaccionan con el antígeno dependiente de glucosilación presente exclusivamente en la parte escindida de la molécula, la verdadera distribución de la expresión de MUC16 se desconoce (21). No existe en la actualidad ningún anticuerpo disponible para seguir el destino del fragmento proteico de MUC16 restante después de la escisión y liberación de CA125.

El documento US 2004/057952 desvela anticuerpos anti MUC16 que se unen a la región no desprendida extracelular C terminal de MUC16.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de identificación de anticuerpos que se dirigen contra secuencias en la cadena principal peptídica de MUC16, y que son útiles para el diagnóstico y tratamiento de cánceres en los que se expresa y/o sobreexpresa MUC16.

50 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un polipéptido, o parte antigénica del mismo, en donde el polipéptido es TLDRSSVLVDGYSPNRNE (SEQ ID NO: 02). En una realización, el anticuerpo se internaliza en una célula. En otra realización, el anticuerpo carece de unión específica con un dominio extracelular de MUC16 glucosilado. El anticuerpo se une específicamente al polipéptido 2 (SEQ ID NO: 02) del polipéptido de ectodomio de MUC16, y en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada variable (V_H) codificada por SEQ ID NO: 06 y una cadena ligera variable (V_L) codificada por SEQ ID NO: 07. En una realización alternativa, el anticuerpo se selecciona del grupo de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo presentado en la superficie de un fago. En otra realización, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')2 y un fragmento Fv. En una realización alternativa, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une covalentemente a un agente citotóxico o un profármaco de un agente citotóxico. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por una línea celular de hibridoma.

La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, producido por una línea celular de hibridoma, en donde el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido, o parte antigénica del mismo. El polipéptido de ectodomio de MUC16 comprende Polipéptido 2 (SEQ ID NO: 02) y en el que el anticuerpo puede ser 4H11.2.5. La invención proporciona adicionalmente una composición que comprende 5 (a) uno cualquiera o más de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se describen en el presente documento y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido, o parte antigénica del mismo, como se define en el presente documento.

10 La invención enseña adicionalmente un método para detectar una enfermedad que comprende sobreexpresión de MUC16 en un sujeto, que comprende a) proporcionar i) una muestra de un sujeto y ii) uno cualquier o más de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se describen en el presente documento, b) poner en contacto la muestra con un anticuerpo en condiciones para la unión específica del anticuerpo con su antígeno y 15 c) detectar un nivel aumentado de unión del anticuerpo con la muestra en comparación con una muestra de control sin la enfermedad, detectando de este modo la enfermedad en el sujeto. En una realización, la enfermedad es cáncer. En una realización preferida, el cáncer se selecciona del grupo de cáncer ovárico y cáncer de mama. Aunque sin pretender limitar el método de detección, en una realización, la detección de unión del anticuerpo con la muestra es inmunohistoquímica, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), separación de células 20 activadas por fluorescencia (FACS), transferencia de Western, inmunoprecipitación y/o captura de imágenes radiográficas.

25 También se proporciona en el presente documento un método para tratar una enfermedad que comprende sobreexpresión de MUC16, que comprende administrar a un sujeto que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de uno cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se describen en el presente documento. En una realización, la enfermedad es cáncer, como se ejemplifica por cáncer ovárico y cáncer de mama.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1: Tres péptidos carboxilo terminal MUC16 se sintetizaron en la Instalación Central de Microquímica de MSKCC. El Polipéptido 1 está cerca del sitio de escisión potencial, el Polipéptido 2 está antes de la transmembrana y el Polipéptido 3 es el péptido interno, que está dentro de la transmembrana.

35 Figura 2: Comparación de tinción de carcinomas ováricos serosos de grado alto usando OC125 (panel izquierdo) y 4H11 (panel derecho).

Figura 3: Puntuación inmunohistoquímica de OC125 y 4H11 en micromatrices tisulares de carcinoma seroso ovárico de alto grado. Solamente se consideró positiva la tinción membranosa y/o citoplasmática. Puntuación 0: sin tinción; Puntuación 1: <5 % fuerte o débil; Puntuación 2: 5-50 % fuerte o débil; Puntuación 3: 51-75 % fuerte o 40 51-100 % débil; Puntuación 4: 76-99 % fuerte; Puntuación 5: 100 % fuerte. Figura 3A: OC125 (Puntuación 0); Figura 3B: OC125 (Puntuación 1); Figura 3C: OC125 (Puntuación 2); Figura 3D: OC125 (Puntuación 3); Figura 3E: OC125 (Puntuación 4); Figura 3F: OC125 (Puntuación 5); Figura 3G: 4H11 (Puntuación 0); Figura 3H: 4H11 (Puntuación 1); Figura 3I: 4H11 (Puntuación 2); Figura 3J: 4H11 (Puntuación 3); Figura 3K: 4H11 (Puntuación 4); Figura 3L: 4H11 (Puntuación 5).

45 Figura 4: Análisis de transferencia de Western. Figura 4A: análisis de transferencia de Western de proteína de fusión GST-ΔMUC16^{c114} con anticuerpos monoclonales 9C9.21.5.13 y 4H11.2.5. Figura 4B: análisis de transferencia de Western de extracto de proteínas SKOV3-phrGFP-ΔMUC16^{c114} y SKOV3-phrGFP-AMUC16^{c334} y explorados con anticuerpos monoclonales 9C9.21.5.13 y 4H11.2.5.

50 Figura 5A: Afinidad de unión de anticuerpos monoclonales del extremo carboxilo terminal de MUC16 en células OVCAR3 (Paneles A-D). Figura 5B: internalización de anticuerpos monoclonales 4H11 y OC125 radiomarcados en células transfectadas estables SKOV3-phrGFP-ΔMUC16^{c334}.

Figura 6A-D: Comparación de intensidades de tinción de anticuerpos monoclonales OC125 y 4H11 en micromatrices tisulares que contienen cánceres de próstata (2A, concordante), pulmón (2B, discordante), mama (2C, discordante) y páncreas (2D, discordante).

55 Figura 7: Se realizó análisis de FACS como se describe en la sección de Material y Métodos con anticuerpos comerciales y anticuerpos monoclonales de extremo carboxilo terminal de MUC16 en líneas celulares transfectadas estables OVCAR3 wt, SKOV3-phrGFP-ΔMUC16^{c114} y SKOV3-phrGFP-ΔMUC16^{c334}.

Figura 8: Secuencia de nucleótidos que codifica cadena pesada variable de anticuerpo (V_H) y cadena ligera variable de anticuerpo (V_L). (A) 4A5 V_H (SEQ ID NO: 04), (B) 4A5 V_L (SEQ ID NO: 05), (C) 4H11 V_H (SEQ ID NO: 06), (D) 4H11 V_L (E) 9B11 V_H (SEQ ID NO: 08), (F) 9B11 V_{L,A} (SEQ ID NO: 09), (G) 9B11 V_{L,B} (SEQ ID NO: 10), (H) 24B3 V_H (SEQ ID NO: 11), (I) 24B3 V_L (SEQ ID NO: 12).

60 Figura 9: (A) MUC16 de *Homo sapiens* (GenBankNP_078966) (SEQ ID NO: 13), (B) Polipéptido 1 (SEQ ID NO: 01), (C) Polipéptido 2 (D) SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 03), (E) dominio transmembrana (SEQ ID NO: 14), (F) Polipéptido 4 (SEQ ID NO: 15) que contiene un péptido de bucle de cisteína (SEQ ID NO: 19).

Figura 10: Esquema de la estructura de MUC16.

65 Figura 11. Diseño y análisis *in vitro* de CAR dirigidos a MUC-CD. (A) Diagrama esquemático de los vectores retrovirales de primera generación 4H11z y segunda generación 4H11-28z. 4H11scFv: scFv específico de

MUC16 derivado de las regiones variables de cadena pesada (V_H) y ligera (V_L) del anticuerpo monoclonal 4H11; CD8: dominios de bisagra y transmembrana de CD8; CD28: dominios de señalización transmembrana y citoplasmáticos de CD28; cadena ζ : dominio de señalización citoplasmático de cadena ζ del receptor de linfocitos T; LTR: repetición terminal larga; caja negra: secuencia líder de CD8; caja gris: enlazador de (Gly4Ser)₃; las flechas indican el inicio de la transcripción. (B) análisis de FACS de linfocitos T humanos transducidos de forma retroviral para expresar el CAR 4H11z o 19z1. (C) Los linfocitos T 4H11z⁺ pero no los 19z1⁺ se expanden en AAPC 3T3 (MUC-CD/B7.1). Se cocultivaron CAR⁺ en monocapas de AAPC 3T3 (MUC-CD/B7.1) a 3×10^6 linfocitos T CAR⁺/pocillo de una placa de 6 pocillos. Proliferación de linfocitos T CAR⁺, normalizada con respecto a la fracción de linfocitos T CAR⁺ como se evaluó por FACS para la fracción CAR⁺ en combinación con recuentos de linfocitos T viables obtenidos los días 2, 4 y 7, como se evaluó por ensayos de exclusión de azul de tripano.

Figura 12. Comparación *in vitro* de linfocitos T modificados para expresar el CAR 4H11z de primera generación con linfocitos T modificados para expresar el CAR 4H11-28z coestimulante de segunda generación. (A) Los linfocitos T CAR⁺ se cocultivaron en monocapas de MUC-CD con (panel derecho) o sin B7.1 (panel izquierdo). Se cocultivaron 3×10^6 CAR⁺ en monocapas de AAPC en placas de cultivo tisular de 6 pocillos en medio sin citocinas. Los recuentos de linfocitos T viables totales se evaluaron los días 2, 4 y 7, mediante ensayos de exclusión de azul de tripano. Los linfocitos T 4H11-28z⁺ se expandieron notablemente en comparación con linfocitos T 4H11z⁺ tras cocultivo con AAPC 3T3 (MUC-CD), **p=0,0023 (4H11z en comparación con 4H11-28z). Por el contrario, los linfocitos T tanto 4H11z⁺ como 4H11-28z⁺ se expandieron de forma similar en AAPC 3T3 (MUC-CD/B7.1), p=0,09, (4H11z en comparación con 4H11-28z). Los linfocitos T 19-28z⁺ de control no proliferaron en 3T3 (MUC-CD), **p=0,0056 (19-28z en comparación con 4H11z), **p=0,0011 (19-28z en comparación con 4H11-28z), o en 3T3 (MUC-CD/B7.1), **p=0,0026 (19-28z en comparación con 4H11z), **p=0,0087 (19-28z en comparación con 4H11-28z). (B) Los linfocitos T 4H11-28z⁺ pero no 4H11z⁺ secretan IL-2 tras cocultivo con AAPC 3T3 (MUC-CD). Los sobrenadantes de cultivo tisular el día 2 después de la activación en AAPC 3T3 (MUC-CD) se analizaron con respecto a secreción de citocinas. Los linfocitos T 4H11-28z⁺, a diferencia de los linfocitos T 4H11z⁺, demostraron secreción potenciada de IL-2 coherente con la coestimulación de linfocitos T mediada a través de CAR 4H11-28z. ***p=0,0008 (19z1 o 19-28z en comparación con 4H11z), **p=0,0026 (19z1 o 19-28z en comparación con 4H11-28z), **p=0,0046 (4H11z en comparación con 4H11-28z). Además, los linfocitos T tanto 4H11-28z⁺ como 4H11z⁺ secretaron IFN γ . *p=0,011 (4H11z en comparación con 4H11-28z). Los linfocitos T de control 19z1 y 1928z transducidos no consiguieron secretar IL-2 o IFN γ . **p=0,0034 (19z1 en comparación con 4H11z), **p=0,036 (19-28z en comparación con 4H11z), ***p=0,0008 (19-28z en comparación con 4H11-28z). (C) Expansión de linfocitos T CAR⁺ después de 3 ciclos de estimulación en 3T3 (MUC-CD/B7.1). Los linfocitos T humanos transducidos para expresar CAR 4H11z o 4H11-28z demostraron una expansión >2 log durante 2 ciclos de estimulación en AAPC 3T3 (MUC-CD/B7.1). Las flechas indican los ciclos 1 y 2 de reestimulación en AAPC. (D) Análisis de FACS de la fracción de linfocitos T CAR⁺ de linfocitos T 4H11-28z⁺ aumentados después de cada ciclo semanal de estimulación. (I) FACS después de transducción inicial, (II) FACS a los 7 días después de la primera estimulación en AAPC, (III) FACS a los 7 días después de la segunda estimulación en AAPC. Estos datos son representativos de uno de tres experimentos diferentes usando tres poblaciones de linfocitos T donadoras sanas diferentes, todas las cuales demostraron patrones de secreción de citocinas y proliferación similares.

Figura 13. Los linfocitos T dirigidos a MUC-CD se expanden específicamente y lisan células tumorales MUC-CD⁺. (A) El ensayo de citotoxicidad de linfocitos T 4H1z⁺ y 4H11-28z⁺ que se dirigen a células tumorales OV-CAR (MUC-CD) demuestra citotoxicidad eficaz mediada por linfocitos T de donantes sanos modificados para expresar los CAR dirigidos a MUC-CD de primera y segunda generación. Los linfocitos T de control modificados para expresar las CAR 19z1 y 19-28z dirigidos a CD19 de primera y segunda generación no consiguieron demostrar lisis significativa de células tumorales diana. (B) Linfocitos T donadores sanos modificados para expresar el CAR 4H11-28z lisan igualmente células tumorales MUC-CD⁺ derivadas de líquido ascítico de pacientes primarios en comparación con linfocitos T modificados para expresar el CAR 19-28z de control. Estos datos representan 1 o 3 experimentos que se dirigen a células tumorales primarias de 3 pacientes de carcinoma ovárico con resultados similares. (C) Linfocitos T autólogos aislados de sangre periférica, cuando se modifican con el CAR 4H11-28z, muestran lisis significativa de células tumorales derivadas de líquido ascítico MUC-CD⁺ autólogas en comparación con linfocitos T autólogos 19-28z⁺ de control. Estos datos representan 1 de 3 experimentos que utilizan linfocitos T y células tumorales autólogas de 3 pacientes de carcinoma ovárico diferentes con resultados similares. (D) Proliferación específica de antígenos de linfocitos T marcados con CFSE dirigidos a MUC-CD después de cocultivo con células tumorales OV-CAR3 (MUC-CD). Se cocultivaron linfocitos T CAR⁺ marcadas con CFSE con células tumorales OV-CAR3 que expresaban MUC-CD a una relación 1:1 durante 5 días. Se evaluó la proliferación de linfocitos T marcados con CFSE mediante FACS lo que demostró proliferación eficaz de linfocitos T tanto 4H11z⁺ como 4H11-28z⁺ pero no linfocitos T 19-28z⁺ de control. (E) Los resultados de CFSE se confirmaron adicionalmente por los números de linfocitos T absolutos evaluados los días 2, 4 y 7 después de cocultivo con células tumorales OV-CAR3(MUC-CD). (F) Análisis de FACS de la expresión de 4-1BBL en células OVCAR3(MUC-CD). Se tiñeron células OV-CAR3(MUC-CD) con anticuerpo 4-1BBL anti humano (línea gruesa) o con control de isótipo (línea fina). El análisis de FACS demostró expresión de 4-1BBL en células tumorales OV-CAR3(MUC-CD). Análisis de FACS adicionales no consiguieron revelar expresión de los ligandos coestimulantes B7.1, B7.2 u OX-40L.

Figura 14. Erradicación de tumores OV-CAR3(MUC-CD) después del tratamiento intraperitoneal con primera y segunda generación de linfocitos T dirigidos a MUC-CD. (A) Inyección intraperitoneal de tumores OV-CAR3(MUC-CD) en ratones Beige SCID da como resultado distensión abdominal y tumores peritoneales

5 nodulares. Se inyectó a ratones Beige SCID por vía intraperitoneal 3×10^6 células OV-CAR3(MUC-CD). A las 5 semanas después de inyección intraperitoneal de células tumorales OV-CAR3(MUC-CD), los ratones desarrollaron ascitis como se demuestra por un abdomen distendido (panel central) en comparación con un ratón sin tumor (panel izquierdo). La visualización post mortem del peritoneo demuestra masas tumorales nodulares (flechas) dentro de la cavidad abdominal (panel derecho). (B) Inyección intraperitoneal de linfocitos T 4H11z⁺ y 4H11-28z⁺ retardan la progresión tumoral o erradicarán completamente la enfermedad. La curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones Beige SCID tratados con primera o segunda generación de linfocitos T dirigidos a MUC-CD. Se infundió a ratones Beige SCID ip 3×10^6 células tumorales OV-CAR3(MUC-CD) el día 1 seguido de 3×10^7 de linfocitos T 4H11z⁺ o 4H11-28z⁺ el día 2. Todos los ratones no tratados o ratones tratados con linfocitos T 19z1⁺ de control desarrollaron tumores establecidos y se sacrificaron al día 50. Por el contrario, el 27 % de los ratones tratados con linfocitos T 4H11z⁺ o 4H11-28z⁺ permanecieron sin pruebas clínicas de enfermedad el día 120. *p=0,01 (4H11z en comparación con 19z1), **p=0,0023 (4H11-28z en comparación con 19z1), p=0,63 (4H11z en comparación con 4H11-28z).

10 Figura 15. Linfocitos T 4H11-28z⁺ dirigidos a MUC-CD se transportan con éxito a tumores OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) ip después de infusión intravenosa sistémica que da como resultado una eficacia antitumoral igualmente eficaz en comparación con ratones portadores de tumores tratados con 4H11-28z⁺ ip. (A) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones Beige SCID tratados ip o iv con linfocitos T 4H11-28z⁺. Se inyectó a ratones Beige SCID por vía intraperitoneal 3×10^6 células tumorales OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) seguido de infusión iv o ip de 3×10^7 linfocitos T 4H11-28z⁺. La erradicación tumoral se potencia después de infusión ip o iv de linfocitos T 4H11-28z⁺ en comparación con ratones tratados con control. Los ratones tratados con linfocitos T 4H11-28z⁺ tanto ip como iv mostraron supervivencia estadísticamente potenciada (**p<0,0001 y **p=0,0038, respectivamente) en comparación con cohortes de control tratadas con linfocitos T 19-28z⁺. Por el contrario, la diferencia de supervivencia entre las cohortes de linfocitos T 4H11-28z⁺ ip e iv no fue estadísticamente significativa (p=0,22). (B) BLI de progresión tumoral de ratones tratados con linfocitos T 4H11-28z⁺ ip e iv representativos con enfermedad en última instancia progresiva después de tratamiento en comparación con BLI de progresión tumoral en un ratón tratado con linfocitos T 19-28z⁺ de control representativo. (C) Tráfico de linfocitos T 4H11-28z⁺ teñidos con CFSE inyectados de forma sistémica a tumores OV-CAR(MUC-CD) ip avanzados. La presencia de linfocitos T de control 19-28z⁺ marcados con CFSE inyectado iv (panel izquierdo) y linfocitos T 4H11-28z⁺ (panel derecho) 1 día después de la infusión en ratones Beige SCID con tumores OV-CAR(MUC-CD) avanzados (inyectados 7 días después), como se evaluó por análisis de FACS de suspensiones tumorales de OV-CAR3(MUC-CD) de células individuales, revela una población notable de 4H11-28z⁺ pero no linfocitos T 19-28z⁺ de control dentro de tumores OV-CAR3(MUC-CD) peritoneales.

15 Figura 16. Erradicación de tumores OV-CAR3(MUC-CD) avanzados en ratones Beige SCID por infusión ip de linfocitos T 4H11-28z⁺. Se inyectó a ratones Beige SCID ip 3×10^6 células tumorales OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) 7 días antes del tratamiento ip con 3×10^7 linfocitos T 4H11-28z⁺. (A) BLI de ratones tratados con linfocitos T 4H11-28z⁺ con enfermedad recidivante (fila media) o enfermedad erradicada (fila inferior) en comparación con un ratón de control tratado con linfocitos T 19-28z⁺ representativo. (B) curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones Beige SCID con tumores OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) avanzados tratados ip con linfocitos T 4H11-28z⁺. Todos los ratones tratados con linfocitos T 4H11-28z⁺ demostraron supervivencia potenciada en comparación con ratones tratados con linfocitos T 19-28z⁺ de control (**p=0,0011), con una supervivencia a largo plazo general del 25 % el día 120.

20 Figura 17: Secuencia líder de CD8, secuencia de dominio intracelular de cadena zeta de CD3, secuencia enlazadora de serina-glicina (G4S)3, secuencia de dominio transmembrana de CD8 y secuencia de dominios intracelular + transmembrana de CD28 (-TERMINACIÓN).

25 Figura 18: Secuencia de SFG_4H11z.

30 Figura 19: Secuencia de SFG-4H11-28z.

35 Figura 20: (A) Péptido 1 de MUC16-CD de ratón (SEQ ID NO: 21), Péptido 2 de primer Bucle de Cisteína de Ratón (SEQ ID NO: 22) y Péptido 3 de segundo Bucle de Cisteína de Ratón (SEQ ID NO: 23). (B) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de MUC16 de ratón (SEQ ID NO: 24) y MUC16 humano (SEQ ID NO: 25). Se añadió una cisteína a la secuencia peptídica en el extremo N de Péptido 1 y Péptido 3 para mejor conjugación con KLH.

40 Figura 21: Extracto de ID8 con dilución 1:10 de sobrenadantes primarios monoclonales de MUC16 de ratón.

45 Figura 22: Extracto de BR5-FVB1 con dilución 1:10 de sobrenadantes primarios monoclonales de MUC16 de ratón.

50 Figura 23: Transferencia de Western que muestra 38 sobrenadantes de anticuerpos monoclonales de ratón en extractos celulares ID8.

55 Figura 24: (A) Secuencia de nucleótidos que codifica 12B10-3G10-V_H (SEQ ID NO: 26), (B) secuencia de aminoácidos 12B10-3G10-V_H (SEQ ID NO: 27), (C) secuencia de nucleótidos que codifica 12B10-3G10-V_L (SEQ ID NO: 28) (obsérvese que V_L tiene un sitio *NotI* opcional añadido por el cebador para clonación, y (D) secuencia de aminoácidos de 12B10-3G10-V_{LA} (SEQ ID NO: 29)

60 Figura 25: Análisis de FACS con mAb 12B10-3G10 purificado en líneas celulares ID8 (ratón), OVCAR-3 (humana) y BR5-FVB1 (ratón).

Definiciones

65

Para facilitar el entendimiento de la invención, se definen posteriormente varios términos.

- Los términos "purificado", "aislado" y equivalentes gramaticales de los mismos como se usa en el presente documento, se refieren a la reducción en la cantidad de al menos un componente indeseable (tal como célula, proteína, secuencia de ácido nucleico, carbohidrato, etc.) de una muestra, incluyendo una reducción en cualquier porcentaje numérico de 5 % a 100 %, tal como, pero sin limitación, de 10 % a 100 %, de 20 % a 100 %, de 30 % a 100 %, de 40 % a 100 %, de 50 % a 100 %, de 60 % a 100 %, de 70 % a 100 %, de 80 % a 100 % y de 90 % a 100 %. Por lo tanto, la purificación da como resultado un "enriquecimiento", es decir, un aumento en la cantidad de un componente deseable (célula, proteína, secuencia de ácido nucleico, carbohidrato, etc.).
- 5
- El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc.). La unidad 10 funcional básica de cada anticuerpo es un monómero de inmunoglobulina (Ig) (que contiene solamente una unidad de inmunoglobulina ("Ig")). Se incluye dentro de esta definición anticuerpo políclonal, anticuerpo monoclonal y anticuerpo químérico.
- 15
- La parte variable de un anticuerpo es su "dominio V" (también denominado "región variable"), y la parte constante es su "dominio C" (también denominado "región constante"), tal como las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu. El "dominio variable" también se denomina la "región V_L " y es la región más importante 20 para la unión a antígenos. Más específicamente, los bucles variables, tres cada uno en las cadenas ligera (V_L) y pesada (V_H) son responsables de unión con el antígeno. Estos bucles se denominan "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR" e "idiotipos").
- 25
- El monómero de inmunoglobulina (Ig) de un anticuerpo es una molécula en forma de "Y" que contiene cuatro 30 cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, unidas por enlaces disulfuro.
- Las cadenas ligeras se clasifican como (λ) o kappa (κ). Una cadena ligera tiene dos dominios sucesivos: un dominio constante ("C L ") y un dominio variable ("V L "). El dominio variable, V L , es diferente en cada tipo de anticuerpo y es la 35 parte activa de la molécula que se une al antígeno específico. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos.
- Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante y la región variable. Hay cinco tipos de cadenas 40 pesadas de Ig de mamífero indicadas como α , δ , ϵ , γ y μ . El tipo de cadena pesada presente define la clase del anticuerpo; estas cadenas se encuentran en anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Las distintas cadenas pesadas difieren en su tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ tienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante ("C H ") y la región variable ("V H "). La región constante (C H) es idéntica en todos los anticuerpos del mismo 45 isotipo, pero difiere en anticuerpos de diferentes isotipos. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta de tres dominios Ig en tandem (en una línea) y una región bisagra para mayor flexibilidad. Las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina. La región variable (V H) de la cadena pesada difiere en anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B, pero es igual para todos los 50 anticuerpos producidos por un único linfocito B o clón de linfocito B. La región variable de cada cadena pesada es de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud.
- La expresión "se une específicamente" y "unión específica" cuando hace referencia a la unión de dos moléculas (por ejemplo anticuerpo para un antígeno, etc.) se refieren a una interacción de las dos moléculas que dependen de la 55 presencia de una estructura particular en una o ambas de las moléculas. Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo "A" en la molécula, entonces la presencia de una proteína que contiene el epítipo A (o A libre, no marcado) en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.
- La expresión "capaz de unirse" cuando hace referencia a la interacción entre una primera molécula (tal como un 60 anticuerpo, polipéptido, glucoproteína, secuencia de ácido nucleico, etc.) y una segunda molécula (tal como antígeno, polipéptido, glucoproteína, secuencia de ácido nucleico, etc.) significa que la primera molécula se une a la segunda molécula en presencia de una concentración adecuada de sales, y temperatura adecuada, y pH. Las condiciones para la unión a moléculas pueden determinarse usando métodos rutinarios y/o disponibles en el comercio.
- Las expresiones "antígeno", "inmunógeno", "antigénico", "inmunogénico", "antigénicamente activo", "inmunológico" e "inmunológicamente activo" cuando hacen referencia a una molécula se refieren a cualquier sustancia que sea 65 capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral específica (incluyendo inducir una respuesta de anticuerpo soluble) y/o respuesta inmunitaria mediada por células (incluyendo inducir una respuesta de CTL). Los péptidos antígenicos preferentemente contienen al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 y más preferentemente al menos 10 aminoácidos. Para inducir producción de anticuerpos, en una realización, los antígenos pueden conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH) o fusionarse con glutatión-S-transferasa (GST).
- Un "antígeno afín" cuando hace referencia a un antígeno que se une a un anticuerpo se refiere a un antígeno que es capaz de unirse específicamente al anticuerpo.

En una realización, el antígeno comprende un epítopo. Las expresiones "epítopo" y "determinante antigénico" se refieren a una estructura en un antígeno, que interacciona con el sitio de unión de un anticuerpo o receptor de linfocitos T como resultado de complementariedad molecular. Un epítopo puede competir con el antígeno intacto, del que deriva, por la unión con un anticuerpo.

- 5 Como se usa en el presente documento, los términos "parte" y "fragmento" cuando hacen referencia a una secuencia de ácido nucleico o secuencia de proteína se refieren a un trozo de esa secuencia que puede variar de tamaño de 2 nucleótidos y aminoácidos contiguos, respectivamente, a la secuencia completa menos un nucleótido y aminoácido, respectivamente.
- 10 Un "sujeto" que puede beneficiarse de los métodos de la invención incluye cualquier animal multicelular, preferentemente un mamífero. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, primates no humanos, murinos, ovinos, bovinos, rumiantes, lagomorfos, porcinos, caprinos, equinos, caninos, felinos, aves, etc. Por lo tanto, los sujetos mamíferos se ejemplifican por ratón, rata, cobaya, hámster, hurón y chinchilla. Las composiciones y métodos de la invención también son útiles para un sujeto "que necesite reducir uno o más síntomas de una enfermedad, por ejemplo, que necesite reducir metástasis de cáncer y/o que necesite reducir uno o más síntomas de cáncer, incluyendo un sujeto que muestre y/o esté en riesgo de mostrar uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, los sujetos pueden estar en riesgo basándose en el historial familiar, factores genéticos, factores ambientales, etc. Este término incluye modelos animales de la enfermedad. Por lo tanto, la administración de una composición (que reduce una enfermedad y/o que reduce uno o más síntomas de una enfermedad) a un sujeto que necesite reducir la enfermedad y/o reducir uno o más síntomas de la enfermedad incluye administración profiláctica de la composición (es decir, antes de que la enfermedad y/o uno o más síntomas de la enfermedad sean detectables) y/o administración terapéutica de la composición (es decir, después de que la enfermedad y/o uno o más síntomas de la enfermedad sean detectables). Las composiciones y métodos de la invención también son útiles para un sujeto "en riesgo" de una enfermedad (tal como cáncer) que se refiere a un sujeto que está predispuesto a contraer y/o expresar uno o más síntomas de la enfermedad. Esta predisposición puede ser genética (por ejemplo, una tendencia genética particular a expresar uno o más síntomas de la enfermedad, tales como trastornos heredables, etc.), o debido a otros factores (por ejemplo, condiciones ambientales, exposiciones a compuestos perjudiciales, incluyendo carcinógenos, presentes en el ambiente, etc.). La expresión sujeto "en riesgo" incluye sujetos "que padecen la enfermedad", es decir, un sujeto que experimenta uno o más síntomas de la enfermedad. No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna señal o síntoma particular. Por lo tanto, se pretende que la presente invención abarque sujetos que experimenten cualquier intervalo de enfermedad, de síntomas subclínicos a enfermedad completa, en los que el sujeto muestra al menos uno de los indicios (por ejemplo, señales y síntomas) asociados con la enfermedad.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- "Célula cancerosa" se refiere a una célula que experimenta estadios tempranos, intermedios o avanzados de progresión neoplásica multietapa como se ha descrito previamente (Pitot *et al.*, *Fundamentals of Oncology*, 15-28 (1978)). Esto incluye células en estadios tempranos, intermedios y avanzados de progresión neoplásica incluyendo "células preneoplásicas" (es decir, "células hiperplásicas y células displásicas") y células neoplásicas en estadios avanzados de progresión neoplásica de una célula displásica.
- La célula cancerosa "metastásica" se refiere a una célula cancerosa que se traslada de un sitio de cáncer primario (es decir, una localización en la que la célula cancerosa se formó inicialmente a partir de una célula normal, hiperplásica o displásica) a un sitio distinto del sitio primario, en el que la célula cancerosa trasladada se aloja y prolifera.
- "Cáncer" se refiere a una pluralidad de células cancerosas que pueden ser o no metastásicas, tales como cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de boca, cáncer de lengua, cáncer de encías, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, carcinoma de células basales, sarcoma de Kaposi, etc.), cáncer de músculo, cáncer de corazón, cáncer de hígado, cáncer bronquial, cáncer de cartílago, cáncer de hueso, cáncer de testículo, cáncer de riñón, cáncer de endometrio, cáncer de útero, cáncer de vejiga, cáncer de médula ósea, cáncer de linfoma, cáncer de bazo, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer neuronal, mesotelioma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer ocular (por ejemplo, cáncer de la córnea, cáncer de la úvea, cáncer del coroides, cáncer de la mácula, cáncer de humor vítreo, etc.), cáncer de la articulación (tal como cáncer de sinovia), glioblastoma, linfoma y leucemia.
- "Muestra" y "muestra de ensayo" como se usan en el presente documento se usan en su sentido más amplio para incluir cualquier composición que se obtenga y/o derive de una fuente biológica, así como dispositivos de toma de muestras (por ejemplo, hisopos) que se ponen en contacto con muestras biológicas o ambientales. "Muestras biológicas" incluyen las obtenidas de un sujeto, incluyendo fluidos corporales (tales como orina, sangre, plasma, materia fecal, líquido cefalorraquídeo (LCR), semen, esputo y saliva), así como tejido sólido. Las muestras biológicas también incluyen una célula (tal como líneas celulares, células aisladas de tejido tanto si las células aisladas se cultivan como si no después del aislamiento del tejido, células fijadas tales como células fijadas para análisis histológico y/o inmunohistoquímico), tejido (tal como material de biopsia), extracto celular, extracto tisular y ácido nucleico (por ejemplo, ADN y ARN) aislado de una célula y/o un tejido, y similares. Estos ejemplos son ilustrativos, y

no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestras aplicables a la presente invención.

La "sobreexpresión de MUC16" por una célula de interés (tal como una célula cancerosa) se refiere a un mayor nivel de proteína MUC16 y/o ARNm que expresa la célula de interés en comparación con una célula de control (tal como una célula no cancerosa, célula normal, etc.).

5 "Internalizar" cuando hace referencia a una célula se refiere a entrada del medio extracelular a la membrana celular y/o el citoplasma.

10 "Glucosilado" cuando hace referencia a una secuencia (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos) se refiere a una secuencia que está unida covalentemente a uno o más sacáridos.

15 La composición "farmacéutica" y "fisiológicamente tolerable" se refiere a una composición que contiene moléculas farmacéuticas, es decir, moléculas que pueden administrarse a un sujeto y que no producen sustancialmente un efecto indeseable tal como, por ejemplo, reacciones adversas o alérgicas, mareos, trastorno gástrico, toxicidad y similares, cuando se administra a un sujeto. Preferentemente también, la molécula farmacéutica no reduce sustancialmente la actividad de las composiciones de la invención. Las moléculas farmacéuticas incluyen moléculas "diluyentes" (es decir, "vehículos") y excipientes.

20 Una cantidad "inmunogénicamente eficaz" y "antigénicamente eficaz" de una molécula se refiere indistintamente a una cantidad de la molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral específica (incluyendo inducir una respuesta de anticuerpo soluble) y/o respuesta inmunitaria mediada por células (incluyendo inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL)).

25 "Tratar" una enfermedad se refiere a reducir uno o más síntomas (tales como objetivos, subjetivos, patológicos, clínicos, subclínicos, etc.) de la enfermedad.

30 Los términos "reducir", "inhibir", "disminuir", "suprimir", "bajar" y equivalentes gramaticales (incluyendo "inferior", "más pequeño", etc.) cuando hacen referencia al nivel de cualquier molécula (por ejemplo, secuencia de aminoácidos y secuencia de ácidos nucleicos, anticuerpo, etc.), célula y/o fenómeno (por ejemplo, síntoma de enfermedad, unión a una molécula, especificidad de unión de dos moléculas, afinidad de unión de dos moléculas, especificidad para cáncer, sensibilidad a cáncer, afinidad de unión, actividad enzimática, etc.), en una primera muestra (o en un primer sujeto) en relación con una segunda muestra (o en relación con un segundo sujeto), significa que la cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es menor que en la segunda muestra (o en el segundo sujeto) por cualquier cantidad que sea estadísticamente significativa usando cualquier método de análisis estadístico aceptado en la técnica. En una realización, la cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es al menos 10 % menor que, al menos 25 % menor que, al menos 50 % menor que, al menos 75 % menor que y/o al menos 90 % menor que la cantidad de la misma molécula, célula y/o fenómeno en la segunda muestra (o en el segundo sujeto). En otra realización, la cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es menor por cualquier porcentaje numérico de 5 % a 100 %, tal como, pero sin limitación, de 10 % a 100 %, de 20 % a 100 %, de 30 % a 100 %, de 40 % a 100 %, de 50 % a 100 %, de 60 % a 100 %, de 70 % a 100 %, de 80 % a 100 % y de 90 % a 100 % menor que la cantidad de la misma molécula, célula y/o fenómeno en la segunda muestra (o en el segundo sujeto). En una realización, el primer sujeto se ejemplifica por, pero sin limitación, un sujeto que se ha manipulado usando las composiciones y/o los métodos de la invención. En una realización adicional, el segundo sujeto se ejemplifica, pero sin limitación, por un sujeto que no se ha manipulado usando las composiciones y/o los métodos de la invención. En una realización alternativa, el segundo sujeto se ejemplifica por, pero sin limitación, un sujeto que se ha manipulado, usando las composiciones y/o los métodos de la invención, a una dosificación diferente y/o durante una duración diferente y/o mediante una vía diferente de administración en comparación con el primer sujeto. En una realización, el primer y el segundo sujeto pueden ser el mismo individuo, tal como cuando se busca determinar en un individuo el efecto de diferentes regímenes (por ejemplo, de dosisificaciones, duración, vía de administración, etc.) de las composiciones y/o los métodos de la invención. En otra realización, el primer y el segundo sujetos pueden ser individuos diferentes, tal como cuando se compara el efecto de las composiciones y/o los métodos de la invención en un individuo que participa en un ensayo clínico y otro individuo en un hospital.

55 Los términos "aumentar", "elevar", "subir" y equivalentes gramaticales (incluyendo "superior", "mayor", etc.), cuando hacen referencia al nivel de cualquier molécula (por ejemplo, secuencia de aminoácidos y secuencia de ácido nucleico, anticuerpo, etc.), célula y/o fenómeno (por ejemplo, síntoma de enfermedad, unión a una molécula, especificidad de unión de dos moléculas, afinidad de unión de dos moléculas, especificidad para cáncer, sensibilidad a cáncer, afinidad de unión, actividad enzimática, etc.) en una primera muestra (o en un primer sujeto) en relación con una segunda muestra (o en relación con un segundo sujeto) significa que la cantidad de la molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es mayor que en la segunda muestra (o en el segundo sujeto) por una cantidad que es estadísticamente significativa usando cualquier método de análisis estadístico aceptado en la técnica. En una realización, la cantidad de la molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) es al menos 10 % mayor que, al menos 25 % mayor que, al menos 50 % mayor que, al menos 75 % mayor que, y/o al menos 90 % mayor que la cantidad de la misma molécula, célula y/o fenómeno en la

- segunda muestra (o en el segundo sujeto). Esto incluye, sin limitación, una cantidad de molécula, célula y/o fenómeno en la primera muestra (o en el primer sujeto) que es al menos 10 % mayor que, al menos 15 % mayor que, al menos 20 % mayor que, al menos 25 % mayor que, al menos 30 % mayor que, al menos 35 % mayor que, al menos 40 % mayor que, al menos 45 % mayor que, al menos 50 % mayor que, al menos 55 % mayor que, al menos 60 % mayor que, al menos 65 % mayor que, al menos 70 % mayor que, al menos 75 % mayor que, al menos 80 % mayor que, al menos 85 % mayor que, al menos 90 % mayor que y/o al menos 95 % mayor que la cantidad de la misma molécula, célula y/o fenómeno en la segunda muestra (o en el segundo sujeto). En una realización, el primer sujeto se exemplifica por, pero sin limitación, un sujeto que se ha manipulado usando las composiciones y/o los métodos de la invención. En una realización adicional, el segundo sujeto se exemplifica por, pero sin limitación, un sujeto que no se ha manipulado usando las composiciones y/o los métodos de la invención. En una realización alternativa, el segundo sujeto se exemplifica por, pero sin limitación, un sujeto que se ha manipulado, usando las composiciones y/o los métodos de la invención, a una diferente dosificación y/o durante un tiempo diferente y/o mediante una vía de administración diferente en comparación con el primer sujeto. En una realización, el primer y el segundo sujetos pueden ser el mismo individuo, tal como cuando se busca determinar en un individuo el efecto de diferentes regímenes (por ejemplo, de dosificaciones, duración, vía de administración, etc.) de las composiciones y/o los métodos de la invención. En otra realización, el primer y el segundo sujetos pueden ser individuos diferentes, tal como cuando se compara el efecto de las composiciones y/o los métodos de la invención en un individuo que participa en un ensayo clínico y otro individuo en un hospital.
- 20 Los términos "alterar" y "modificar" cuando hacen referencia al nivel de cualquier molécula y/o fenómeno se refieren a un aumento o a una reducción.
- 25 La referencia en el presente documento a cualquier intervalo numérico incluye de forma expresa cada valor numérico (incluyendo números fraccionales y números enteros) abarcados por ese intervalo. Para ilustrar, y sin limitación, la referencia en el presente documento a un intervalo de "al menos 50" incluye números enteros de 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, etc., y números fraccionarios 50,1, 50,2, 50,3, 50,4, 50,5, 50,6, 50,7, 50,8, 50,9, etc. En una ilustración adicional, la referencia en el presente documento a un intervalo de "menos de 50" incluye números enteros 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, etc. y números fraccionarios 49,9, 49,8, 49,7, 49,6, 49,5, 49,4, 49,3, 49,2, 49,1, 49,0, etc. En otra ilustración más, la referencia en el presente documento a un intervalo de "5 a 10" incluye cada número entero de 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y cada número fraccionario tal como 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, etc.
- Descripción de la invención**
- 35 La invención proporciona anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a un polipéptido, o parte antigénica del mismo, en el que el polipéptido es TLDRSSVLVDGYSPNRNE (SEQ ID NO: 02).
- 40 Los anticuerpos de la invención y composiciones que los contienen son útiles en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas para enfermedades en las que se sobreexpresa MUC16, tales como cáncer.
- 45 Usando péptidos sintéticos, los inventores indujeron anticuerpos de especificidad novedosa a la parte carboxilo terminal de MUC16, conservada por la célula, próxima al sitio de escisión potencial. Estos anticuerpos se caracterizaron usando análisis de separación de células activadas por fluorescencia, inmunoensayo ligado a enzimas, análisis de transferencia de Western e inmunohistoquímica. Cada uno de los anticuerpos monoclonales seleccionados fue reactivo contra proteína GST-ΔMUC16^{c114} recombinante y la línea celular SKOV3 transfectada con MUC16. Tres anticuerpos, anticuerpos 4H11, 9C9 y 4A5 demostraron altas afinidades por análisis de transferencia de Western y estudios de unión de saturación de células SKOV3 transfectadas, y presentaron internalización de anticuerpos. La positividad inmunohistoquímica con anticuerpo nuevo 4H11 fue similar a OC125, pero con diferencias importantes, incluyendo positividad difusa en cáncer de mama lobular y un pequeño porcentaje de carcinomas ováricos OC125 negativos que mostraron unión a anticuerpo 4H11 intensa y difusa.
- 55 Las composiciones y los métodos de la invención son útiles para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas así como estudios biológicos tales como tráfico de receptores de membrana y acontecimientos intracelulares. Las aplicaciones de diagnóstico incluyen, por ejemplo, detección de cáncer usando captura de imágenes inmunohistoquímica, radiográfica, ensayo immunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS), transferencia de Western y/o detección por inmunoprecipitación.
- 60 La invención se describe además en (A) MUC16, (B) Anticuerpos de la Técnica Anterior, (C) Anticuerpos de la Invención, (D) Líneas Celulares de Híbridoma, (E) Conjugados de los Anticuerpos de la Invención Unidos a Agentes Cítotóxicos y/o Profármacos, (F) Detección de Partes de Muc16 y Aplicaciones de Diagnóstico y (G) Aplicaciones Terapéuticas.

A. MUC16

"MUC16", "MUC-16" y "Mucina 16" se refieren indistintamente a una proteína de membrana de tipo I que es parte de una familia de mucinas unidas. Hay un esquema de Muc16 en la Figura 10, y se muestra una secuencia de aminoácidos de Muc16 humana a modo de ejemplo (SEQ ID NO: 13) en la Figura 9A. Se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de MUC16 de ratón (SEQ ID NO: 24) y MUC16 humana (SEQ ID NO: 25) en la Figura 20B. La expresión "proteína de tipo 1" se refiere a una "proteína de membrana" que está al menos parcialmente incluida en la bicapa lipídica de una célula, un virus y similares, y que contiene una secuencia de dominio transmembrana (TM) incluida en la bicapa lipídica de la célula, el virus y similares. La parte de la proteína en el extremo NH₂ terminal del dominio TM se expone en el lado externo de la membrana, y la parte COOH terminal se expone en el lado citoplasmático.

Recientemente, se ha descrito la secuencia del ADNc que codifica MUC16/CA125 en Yin y Lloyd en 2001 y completado por O'Brien en 2002 (10-12). La proteína MUC16 completa tiene diversos componentes que consisten en una cola citoplasmática con sitios de fosforilación potenciales, un dominio transmembrana, y un dominio externo próximo a un sitio de escisión aparente. Distante del sitio de escisión, el dominio externo liberado contiene 16-20 repeticiones en tandem de 156 aminoácidos, cada uno con muchos sitios de glucosilación potenciales (11). La estructura repetida general (Figura 10) está bien conservada entre mamíferos, pero las repeticiones no son completamente idénticas en composición de aminoácidos exacta.

La proteína MUC16 es parte de una familia de mucinas unidas que incluye tanto MUC1 como MUC4 (13). MUC1 está presente en diversos tejidos y parece señalizar a través de una ruta de beta catenina, interaccionar con receptor de EGF, media en resistencia a fármacos y puede actuar como un oncogén (14-17). La proteína MUC4 también se expresa en diversos tejidos pero es habitual en neoplasias del tracto gastrointestinal (18-20). Por el contrario, el antígeno CA125 ha estado más restringido en su distribución y está presente principalmente en tejidos ginecológicos y se sobreexpresa en neoplasias Múlerianas (21). Sin embargo, el antígeno CA125, reconocido por el anticuerpo OC125, es un antígeno muy glucosilado expresado en la región de repetición en tandem de la proteína MUC16 mayor. Esta glucoproteína normalmente se desprende de un sitio de escisión potencial en el dominio extracelular de la cadena principal de péptido de MUC16.

Por lo tanto, la proteína "MUC16" contiene (a) un "dominio citoplasmático", (b) un "dominio transmembrana" y (c) un "dominio extracelular". El dominio extracelular de MUC16 contiene un sitio de escisión entre un ectodominio no glucosilado y un ectodominio glucosilado grande de repeticiones en tandem.

Las expresiones "dominio citoplasmático", "cola citoplasmática" y "CT" se usan indistintamente para hacer referencia a una secuencia proteica, y partes de la misma, que está en el lado citoplasmático de la bicapa lipídica de una célula, un virus y similares. Se conocen en la técnica métodos para determinar la CT de una proteína (Elofsson *et al.* (2007) *Annu. Rev. Biochem.* 76: 125-140; Bernsel *et al.* (2005) *Protein Science* 14: 1723-1728).

Las expresiones "dominio transmembrana" y "TM" se usan indistintamente para hacer referencia a una secuencia proteica, y partes de la misma, que abarca la bicapa lipídica de una célula, virus y similares. Se conocen en la técnica métodos para determinar el TM de una proteína (Elofsson *et al.* (2007) *Annu. Rev. Biochem.* 76: 125-140; Bernsel *et al.* (2005) *Protein Science* 14: 1723-1728).

Las expresiones "ectodominio" y "dominio extracelular" se usan indistintamente cuando hacen referencia a una proteína de membrana para hacer referencia a la parte de la proteína que se expone en el lado extracelular de una bicapa lipídica de una célula, virus y similares. Se conocen en la técnica métodos para determinar el ectodominio de una proteína (Singer (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 247-296 y High *et al.* (1993) *J. Cell Biol.* 121: 743-750, y software McVector, Oxford Molecular).

La Muc16 a modo de ejemplo de la Figura 9 contiene (a) un "dominio citoplasmático de MUC16" del aminoácido 14476 al 14507, vttr rkkegeynvq qqcpqyyqsh ldledlq (SEQ ID NO: 16), que interacciona con la maquinaria de transducción de señal intracelular; (b) un "dominio transmembrana de MUC16" del aminoácido 14452 al 14475, aglgvitcl icgvl (SEQ ID NO: 14) que abarca la membrana plasmática; y (c) un "dominio extracelular de MUC16" aminoácidos 1 a 14392 (SEQ ID NO: 13) que contiene un sitio de escisión entre un ectodominio no glucosilado y un ectodominio glucosilado grande de repeticiones en tandem. El "ectodominio de MUC16" se exemplifica por nfsplar rvdrvaiyee flmrtrngtq lqnftldrss vlvdgysprn nepltgnsdl p (SEQ ID NO: 17) del aminoácido 14394 al 14451 de SEQ ID NO: 13 de la Figura 9A.

El ectodominio de MUC16 a modo de ejemplo contiene tanto Polipéptido 1 (nfsplar rvdrvaiyee (SEQ ID NO: 01), que es del aminoácido 14394 al 14410 de SEQ ID NO: 13), y el Polipéptido 2 (ldrss vlvdgysprn ne (SEQ ID NO: 02), que es del aminoácido 14425 al 14442 de SEQ ID NO: 13), contra los que se produjeron anticuerpos a modo de ejemplo y de comparación de la invención. El polipéptido 3, cgvlvttr rkkegeynvq qq (SEQ ID NO: 03) es del aminoácido 14472 al 14492 de SEQ ID NO: 13, y contiene tanto una parte de dominio transmembrana (cgvl) como una parte de dominio citoplasmático (vttr rkkegeynvqqq (SEQ ID NO: 18)). Por lo tanto, el CGVL es opcional en SEQ ID NO: 03, ya que es parte del dominio transmembrana.

El polipéptido 4 (ksyf sdcqvstfrs vprnhhtgvd slcnfspl (SEQ ID NO: 15)), se localiza en una porción no glucosilada del dominio extracelular de Muc16, es del aminoácido 14367 a 14398 de SEQ ID NO: 13, y contiene un polipéptido de bucle de cisteína cqvstfrsvprnhhtgvdslc (SEQ ID NO: 13).

5 **B. Anticuerpos de la técnica anterior**

La expresión del antígeno MUC16/CA125 se ha asociado durante mucho tiempo con tejidos ginecológicos. "CA125", "CA-125", "CA125 escindido" y "CA-125 escindido", se refieren indistintamente al dominio externo glucosilado de la mucina unida MUC16, que está distante del sitio de escisión (Payne *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 7.202.346). Este dominio externo liberado contiene 16-20 repeticiones en tandem de 156 aminoácidos, cada una con sitios de glucosilación potenciales. Un bucle disulfuro basado en cisteína aparente de 19 aminoácidos está presente en todas las repeticiones y el extremo N terminal contiene una estructura en cepillo que está muy glucosilada 0 (11). El tamaño deducido sería de 2,5 MD para la parte proteica, y con carbohidratos añadidos, esto podría aumentar hasta 5 MD (10, 26).

10 15 El CA125, aunque no es suficientemente sensible o específico para usarse como una herramienta de exploración general, se usa rutinariamente para supervisar a pacientes con carcinoma ovárico. Los ensayos usados para medir CA125 son métodos de detección basados en anticuerpos, como lo son las tinciones inmunohistoquímicas realizadas rutinariamente para fines de diagnóstico. La especificidad epitópica de 26 anticuerpos para MUC16 se estudió en el primer informe del Taller de TD-1 de la Sociedad de Biología y Medicina de Oncodesarrollo (ISOBM) y la aplicación de 22 anticuerpos a inmunohistoquímica se presentó en el segundo informe del taller de TD-1 (7, 21). Los anticuerpos existentes se agruparon como de tipo OC125, de tipo M11 o de tipo OV197 y todos los anticuerpos conocidos reconocían epítopos de CA125 en los elementos repetidos, glucosilados en el dominio externo de la mucina unida MUC16, distantes del sitio de escisión potencial.

20 25 La amplia mayoría de anticuerpos reactivos a MUC16, incluyendo OC125, reaccionan con el antígeno dependiente de glucosilación presente exclusivamente en la parte escindida de la molécula de modo que se desconoce la distribución verdadera de expresión de MUC16 (21). No existe en la actualidad ningún anticuerpo disponible para seguir el destino del fragmento proteico de MUC16 restante después de escisión y liberación de CA125.

30 **C. Anticuerpos de la invención**

35 Para explorar mejor la biología de MUC16 humana, los inventores han derivado anticuerpos monoclonales contra la parte extracelular del extremo carboxilo terminal de MUC16, próximo al sitio de escisión potencial, así como un anticuerpo monoclonal contra el dominio citoplasmático interno. A diferencia de anticuerpos anteriores, estos se derivan contra la cadena principal peptídica de MUC16 y no se dirigen a epítopos glucoproteicos complejos. Ya que estos epítopos están próximos a sitio de escisión, es poco probable que se encuentren en circulación y proporcionan nuevas dianas para métodos de diagnóstico e intervenciones terapéuticas. Los datos del presente documento demuestran la identificación y caracterización de anticuerpos a modo de ejemplo desarrollados contra la cadena principal peptídica de MUC16.

40 45 Los inventores han desarrollado nuevos anticuerpos que se dirigen a la cadena principal peptídica no glucosilada, no escindida de MUC16. Estos se ejemplifican por anticuerpos tanto 4H11 como 9C9, que reaccionan con secuencias peptídicas en el ectodominio no escindido de MUC16 y son detectables en la superficie de líneas celulares de cáncer ovárico y en tejidos fijados en parafina de muestras de ensayo quirúrgicas de cáncer ovárico humano. Los anticuerpos muestran alta afinidad y se internalizan fácilmente por células de cáncer ovárico cuando se unen al ectodominio de MUC16. Esto sugiere que la parte próxima de MUC16 tiene una biología independiente de la parte escindida, más distante, de la mucina. También sugiere que las partes próximas de MUC16 pueden proporcionar dianas convenientes para intervenciones de diagnóstico y terapéuticas. La dirección de la cadena principal peptídica de MUC16 proporciona suministro tisular altamente específico para células modificadas por ingeniería genética, liposomas o conjugados de anticuerpos, incluyendo conjugados con los anticuerpos de la invención.

50 55 Los anticuerpos de la invención, ejemplificados por el anticuerpo 4H11, son útiles como herramientas en inmunohistoquímica. Los datos del presente documento muestran que 4H11 es relativamente específico para carcinoma seroso ovárico de alto grado. El carcinoma de mama lobular invasivo es la principal excepción y muestra proteína MUC16 extensiva como se detecta por 4H11. El carcinoma lobular de la mama tiene biología única que se caracteriza por una propensión a metastatizar a superficies serosas (27). Ya que MUC16 es el compañero de unión afín de mesotelina, este puede tener implicaciones importantes para el cáncer lobular (28). Las tasas de discordancia para OC125 y 4H11 también sugieren que 4H11 podría proporcionar información independiente, adicional de OC125 en un subconjunto de carcinomas ováricos. Algunos tumores que son negativos con OC125 conservan partes citoplasmáticas y extracelulares de la glucoproteína MUC16, partes de la molécula que están implicadas probablemente en la transducción de señales potencialmente importantes en el fenotipo maligno.

60 65 La divulgación enseña un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un polipéptido, o parte antigénica del mismo, en el que el polipéptido se ejemplifica por a) polipéptido de ectodominio de MUC16 (ejemplificado por NFSPLAR RVDRVAYEE FLRMTRNGTQ LQNFTLDRSS

VLVDGYSPNR NEPLTGNSDL P (SEQ ID NO: 17)), b) polipéptido de dominio citoplasmático de MUC16 (ejemplificado por VTTRR RKKEGEYNVQ QQ, que está contenida dentro de cada una de CGVLVTTRR RKKEGEYNVQ QQ y LVTTRR RKKEGEYNVQ QQ (SEQ ID NO: 20)), y c) polipéptido de dominio extracelular de MUC16 que contiene un polipéptido de bucle de cisteína CQVST-FRSVPNRHHTGVDSL (SEQ ID NO: 19).

- 5 Una ventaja de los anticuerpos de la invención es que el anticuerpo se internaliza en una célula, siendo de este modo útil en aplicaciones para el suministro dentro de una célula, tal como terapia de enfermedad. "Internalizado" cuando hace referencia a una molécula que está internalizada por una célula se refiere al pase de la molécula que está en contacto con la superficie extracelular de una membrana celular a través de la membrana celular a la superficie intracelular de la membrana celular y/o al citoplasma celular. Se desvelan en el presente documento métodos para determinar la internalización, incluyendo la detección de molécula radiomarcada dentro de la célula (Figura 5B).
- 10 De acuerdo con la invención, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a polipéptido de ectodomio de MUC16 que comprende el polipéptido TLDRSSVLVDGYSPNRNE (SEQ ID NO: 02). Los datos del presente documento muestran que los anticuerpos de la invención y comparativos se unen específicamente a GST- Δ MUC16^{c114} (Ejemplo 2, Tabla 1A). La especificidad de los anticuerpos de la invención se diferencia de los anticuerpos de la técnica anterior (por ejemplo, anticuerpos VK8, M11 y OC125) que no se unían con la proteína purificada GST-MUC16^{c114} o lisados celulares de la línea celular SKOV3-phrGFP- Δ MUC6^{c114} (Ejemplo 2, Figura 2).
- 15 20 En una realización adicional, los anticuerpos de la invención carecen de unión específica con un dominio extracelular de MUC16 glucosilado, exemplificado por el CA-125 escindido descrito en Payne *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 7.202.346.
- 25 30 Las regiones V_L y V_H de los anticuerpos de la invención, comprenden una cadena pesada variable (V_H) codificada por SEQ ID NO: 06 (es decir, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo 4H11 de la Figura 8) y una cadena ligera variable (V_L) codificada por SEQ ID NO: 07 (es decir, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo 4H11 de la Figura 8). En una realización particular, el anticuerpo es quimérico, en el que al menos una de las cadenas V_L y V_H está fusionada con una región constante de inmunoglobulina humana.
- 35 La divulgación enseña un anticuerpo que se une específicamente al Polipéptido 2 (SEQ ID NO: 02) del polipéptido de ectodomio de MUC16, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada variable (V_H) codificada por SEQ ID NO: 04 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo 4A5 de la Figura 8), y una cadena ligera variable (V_L) codificada por SEQ ID NO: 05 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo 4A5 de la Figura 8). El anticuerpo puede ser quimérico en el que al menos una de las cadenas V_L y V_H está unida covalentemente con una región constante de inmunoglobulina humana.
- 40 45 La divulgación enseña un anticuerpo que se une específicamente al Polipéptido 1 (SEQ ID NO: 01) del polipéptido de ectodomio de MUC16, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada variable (V_H) codificada por SEQ ID NO: 08 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo 9B11 de la Figura 8), y una cadena ligera variable (V_L) codificada por al menos una de SEQ ID NO: 09 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable (V_L_A) del anticuerpo 9B11 de la Figura 8) y SEQ ID NO: 10 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable (V_L_B) del anticuerpo 9B11 de la Figura 8). El anticuerpo puede ser quimérico en el que al menos una de las cadenas V_L y V_H está unida covalentemente con una región constante de inmunoglobulina humana.
- 50 Aunque sin pretender restringir la fuente de antígeno a la que se unen los anticuerpos de la invención, en una realización, el polipéptido de ectodomio de MUC16 se expresa por una célula. Los datos del presente documento muestran que los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención se unen a células SKOV3 transducidas con phrGFP- Δ MUC16^{c114} (Ejemplo 2).
- 55 60 La divulgación enseña anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de dominio citoplasmático de MUC16 que comprende VTTRR RKKEGEYNVQ QQ (SEQ ID NO: 18). En una realización particular, el polipéptido del dominio citoplasmático de MUC16 comprende Polipéptido 3 CGVLVTTRRKKEGEYNVQQQ (SEQ ID NO: 03). El polipéptido de dominio citoplasmático de MUC16 puede expresarse por una célula. Por ejemplo, los datos del presente documento muestran que un anticuerpo a modo de ejemplo se une a células SKOV3 transducidas con phrGFP- Δ MUC16^{c114} (Ejemplo 2). La célula puede permeabilizarse para facilitar la internalización del anticuerpo en la célula de modo que entre en contacto con su antígeno citoplasmático.
- 65 La divulgación enseña anticuerpos que se unen a un polipéptido de dominio extracelular de MUC16 que contiene un polipéptido de bucle de cisteína CQVSTFRSVPNRHHTGVDSL (SEQ ID NO: 19). El polipéptido de dominio extracelular de MUC16 puede comprender Polipéptido 4 KSYF SDCQVSTFRS VPNRHHTGVD SLCNFSP (SEQ ID NO: 15).

- La divulgación enseña un anticuerpo que se une específicamente a Polipéptido 4 (SEQ ID NO: 15) del polipéptido de dominio extracelular MUC16, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada variable (V_H) codificada por SEQ ID NO: 11 (es decir, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable (V_H) del anticuerpo 24B3 de la Figura 8), y una cadena ligera variable (V_L) codificada por SEQ ID NO: 12 (es decir, la secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable (V_L) del anticuerpo 24B3 de la Figura 8).
- 5 La invención contempla anticuerpos quiméricos (véase Patente de Estados Unidos n.º 7.662.387), anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo presentado sobre la superficie de un fago (Patente de Estados Unidos N.º 10 7.202.346). En particular, la invención contempla fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo ("región de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno") de la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, dichos fragmentos de unión a antígeno incluyen, pero sin limitación, la región Fab, fragmento $F(ab')2$, fragmento pFc' y fragmentos Fab' .
- 15 La "región Fab" y "fragmento, región de unión a antígeno", se refieren indistintamente a parte de las ramas del anticuerpo de la inmunoglobulina "Y" que actúan en la unión a antígeno. La región Fab está compuesta de un dominio constante y uno variable de cada cadena pesada y ligera del anticuerpo. Se conocen en la técnica métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse *et al.*, *Science*, 246: 1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada. En otra realización, 20 pueden generarse fragmentos Fc y Fab usando la enzima papaína para escindir un monómero de inmunoglobulina en dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. La enzima pepsina escinde por debajo de la región de bisagra, de modo que se forme un "fragmento $F(ab')2$ " y un "fragmento pFc' ". El fragmento $F(ab')$ 2 puede dividirse en dos "fragmentos Fab" por reducción suave.
- 25 La invención también contempla un fragmento de "anticuerpo monocatenario", es decir, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) o variables del anticuerpo completo, y que carecen de algunos o todos de los dominios constantes del anticuerpo. Estos dominios constantes no son necesarios para la unión a antígeno, pero constituyen una parte importante de la estructura de anticuerpos completos. Los fragmentos de anticuerpos monocatenarios son más pequeños que anticuerpos 30 completos y pueden tener por lo tanto mayor permeabilidad capilar que anticuerpos completos, permitiendo a los fragmentos de anticuerpo monocatenarios localizar y unirse a los sitios diana de unión a antígeno diana más eficazmente. Además, pueden producirse fragmentos de anticuerpos en una escala relativamente grande en células procariotas, facilitando de este modo su producción. Además, el tamaño relativamente pequeño de los fragmentos de anticuerpo monocatenarios los hace menos propensos a provocar una respuesta inmunitaria en un receptor que 35 los anticuerpos completos. Se conocen técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios (documento U.S. 4.946.778). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera pueden fusionarse entre sí para formar un "fragmento variable monocatenario" ("fragmentos scFv"), que es solamente la mitad del tamaño del fragmento Fab, pero conserva la especificidad original de la inmunoglobulina parental.
- 40 La "región Fc" y el "fragmento, región cristalizable" se refieren indistintamente a parte de la base de la inmunoglobulina "Y" que actúan en un papel en la modulación de la actividad celular inmunitaria. La región Fc está compuesta de dos cadenas pesadas que contribuyen con dos o tres dominios constantes dependiendo de la clase del anticuerpo. Uniéndose con proteínas específicas, la región Fc asegura que cada anticuerpo genere una respuesta inmunitaria apropiada para un antígeno dado. La región Fc también se une a diversos receptores 45 celulares, tales como receptores de Fc, y otras moléculas inmunitarias, tales como proteínas de complemento. Haciendo esto, media en diferentes efectos fisiológicos incluyendo opsonización, lisis celular y desgranulación de mastocitos, basófilos y eosinófilos. En una situación experimental, pueden generarse fragmentos Fc y Fab en el laboratorio escindiendo un monómero de inmunoglobulina con la enzima papaína en dos fragmentos Fab y un fragmento Fc.
- 50 La invención contempla anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. "Anticuerpo policlonal" se refiere a una inmunoglobulina producida a partir de más de un único clon de células plasmáticas; por el contrario "anticuerpo monoclonal" se refiere a una inmunoglobulina producida a partir de un único clon de células plasmáticas. Están 55 disponibles métodos genéricos para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales que son específicos para un polipéptido deseable. Para la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores mediante inyección con el péptido correspondiente a cualquier molécula de interés en la presente invención, incluyendo pero sin limitación hámsteres, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que posibilite la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Estas incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Köhler y Milstein (Köhler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497 60 (1975)), técnicas que usan animales sin gérmenes y que utilizan tecnología tal como la descrita en el documento PCT/US90/02545, así como la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (véase, por ejemplo, Kozbor *et al.*, *Immunol. Today*, 4: 72 (1983)) y la técnica de hibridoma de VEB para producir anticuerpos 65 monoclonales humanos (Cole *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). En algunas realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, la presente invención

proporciona anticuerpos monoclonales.

También se contemplan anticuerpos químéricos. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo químérico" contiene partes de dos anticuerpos diferentes, normalmente de dos especies diferentes. Véase, por ejemplo: Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567 de Cabilly *et al.*; Patente de Estados Unidos n.º 4.978.745 de Shoemaker *et al.*; Patente de Estados Unidos n.º 4.975.369 de Beavers *et al.*; y Patente de Estados Unidos n.º 4.816.397 de Boss *et al.* Los anticuerpos químéricos incluyen inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo químérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H químérica asociada mediante enlaces disulfuro con una cadena L químérica. Un anticuerpo químérico divalente es un tetrámero (H₂L₂) formado por dos dímeros HL asociados mediante al menos un enlace disulfuro. También puede producirse un anticuerpo químérico polivalente, por ejemplo, empleando una región Hc que se agrega (por ejemplo, cadena H de IgM).

La invención también contempla "anticuerpos humanizados", es decir anticuerpos químéricos que tienen regiones constantes derivadas sustancialmente o exclusivamente de regiones constantes de anticuerpos humanos, y regiones variables derivadas sustancialmente o exclusivamente de la secuencia de la región variable de un mamífero distinto de un ser humano. Los anticuerpos humanizados tienen preferentemente regiones constantes y regiones variables distintas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) derivadas sustancialmente o exclusivamente de las regiones de anticuerpos humanos correspondientes y CDR derivadas sustancialmente o exclusivamente de un mamífero distinto de un ser humano. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en las que se reemplazan restos de una región hipervariable del receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan restos de región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan generalmente para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los restos de FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Pueden generarse anticuerpos humanizados usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.225.539 de Winter *et al.*, que incluye el uso de hibridomas humanos (Cote *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.80: 2026-2030 (1983)) o transformando linfocitos B humanos con virus VEB *in vitro* (Cole *et al.*, en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77-96 (1985)). Los métodos adicionales incluyen, por ejemplo, generación de animales no humanos transgénicos que contienen genes de cadena de inmunoglobulina humana que son capaces de expresar estos genes para producir un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por los genes de inmunoglobulina humana (Patentes de Estados Unidos n.º 5.545.806; 5.569.825 y 5.625.126). También pueden prepararse anticuerpos humanizados sustituyendo las regiones determinantes de complementariedad de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, en un dominio de marco conservado humano (Publicación de PCT n.º WO92/22653).

Resulta importante que los métodos tempranos para humanizar anticuerpos daban con frecuencia como resultado anticuerpos con menor afinidad que el anticuerpo no humano de material de partida. Enfoques más recientes para humanizar anticuerpos abordan este problema haciendo cambios a las CDR. Véase Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20040162413. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados de la invención contienen una región variable heteromérica optimizada (por ejemplo que puede ser parte o no de otra molécula de anticuerpo completo) que tiene afinidad de unión a antígeno igual o mayor que una región variable heteromérica donadora, en el que la región variable heteromérica donadora comprende tres CDR donadoras de cadena ligera, y en el que la región variable heteromérica optimizada comprende: a) una región variable alterada de cadena ligera que comprende: i) cuatro regiones marco conservadas de cadena ligera de línea germinal humana invariantes y ii) tres CDR de región variable alteradas de cadena ligera, en las que al menos una de las tres CDR de región variable alterada de cadena ligera es una variante de CDR donadora de cadena ligera, y en las que la variante de CDR donadora de cadena ligera comprende un aminoácido diferente solamente en una, dos, tres o cuatro posiciones en comparación con una de las tres CDR donadoras de cadena ligera (por ejemplo la al menos una variante de CDR donadora de cadena ligera es idéntica a una de las CDR donadoras de cadena ligera excepto por una, dos, tres o cuatro diferencias de aminoácidos).

Se conocen en la técnica anticuerpos químéricos que contienen secuencias de aminoácidos que se fusionan con regiones constantes de anticuerpos humanos, o con toxinas o con moléculas con efecto citotóxico (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos n.º 7.585.952; 7.227.002; 7.632.925; 7.501.123; 7.202.346; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545; 7.202.346; 6.340.701; 6.372.738; 7.202.346; 5.846.545; 5.585.499; 5.475.092; 7.202.346; 7.662.387; 6.429.295; 7.666.425 y 5.057.313).

65 Pueden explorarse anticuerpos que son específicos para un antígeno particular usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 7.202.346) y desvelados en el presente documento. Por

ejemplo, en la producción de anticuerpos, puede conseguirse exploración para el anticuerpo deseado por radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (por ejemplo, usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisotópicos), transferencias

5 de Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación, etc.), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunolectroforesis, etc.

10 En una realización, se detecta unión de anticuerpo detectando un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta detectando la unión de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo primario. En una realización adicional, se marca el anticuerpo secundario. Se conocen en la técnica muchos medios para detectar la unión en un inmunoensayo y están dentro del alcance de la presente invención. Como se conoce bien en la técnica, el péptido inmunogénico debería proporcionarse libre de la molécula vehículo usada en cualquier protocolo de inmunización. Por ejemplo, si el péptido se conjugó con KLH, este puede conjugarse con BSA, o usarse directamente, en un ensayo de exploración.

15 La divulgación enseña anticuerpos que son anticuerpos monoclonales producidos por una línea celular de hibridoma. El anticuerpo monoclonal puede unirse específicamente a un polipéptido de ectodominio de MUC16 que comprende Polipéptido 1 (SEQ ID NO: 01), como se exemplifica por el anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 9B11.20.16, 10A2, 2F4, 23D3, 30B1 y 31B2 (Tablas 1 y 2). En una realización preferida, el anticuerpo es 9B11.

20 En una enseñanza, el anticuerpo monoclonal se une específicamente a un polipéptido de ectodominio de MUC16 que comprende Polipéptido 2 (SEQ ID NO: 02), en el que el anticuerpo se exemplifica por 4H11.2.5, 13H1, 29G9, 25 9C9.21.5.13, 28F8, 23G12, 9C7.6, 11B6, 25G4, 5C2.17, 4C7, 26B2, 4A5.37, 4A2, 25H3 y 28F7.18.10 (Tablas 1 y 2). En una realización preferida, el anticuerpo se exemplifica por 4H11.2.5, 4A5.37, 9C9.21.5.13, 28F7.18.10, 9C7.6 y 5C2.17. La divulgación enseña un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de dominio citoplasmático de MUC16 que comprende Polipéptido 3 CGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQ (SEQ ID NO: 03), en el que el anticuerpo se exemplifica por 31A3.5.1, 19D1, 10F6, 22E10, 22F1, 3H8, 22F11, 4D7, 24G12, 19G4, 9A5, 4C2, 30 31C8, 27G4 y 6H2 (Tablas 1 y 2). El anticuerpo puede ser 31A3.5.1.

30 La divulgación enseña un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de dominio extracelular de MUC16 que comprende Polipéptido 4 KSYF SDCQVSTFRS VPNRHHTGVD SLCNFSP (SEQ ID NO: 15), en el que el anticuerpo se exemplifica por 24B3 y 9C7 (Tabla 2).

35 Los anticuerpos de la invención y métodos para su uso (tanto de diagnóstico como terapéuticos) son específicos de enfermedad. La "especificidad" de un método y/o una molécula para enfermedad, tal como la "especificidad para cáncer" que se usa indistintamente con "especificidad de cáncer", se refiere a la proporción (por ejemplo, porcentaje, fracción, etc.) de negativos (es decir, individuos sanos que no tienen enfermedad) que se identifican correctamente, 40 es decir, el porcentaje de sujetos sanos que se identifican correctamente como sin enfermedad. La especificidad puede calcularse de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Especificidad} = \text{número de verdaderos negativos} / (\text{número de verdaderos negativos} + \text{número de falsos positivos}).$$

45 Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones y/o los métodos de la invención tienen una "especificidad de cáncer" mayor de 50 %, incluyendo cualquier valor numérico de 51 % a 100 %, tal como 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 50 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 %. Aunque es más deseable una especificidad del 100 %, es decir, no predecir que ninguno del grupo sano tenga cáncer, no es necesario. Los datos del presente documento demuestran la especificidad de cáncer de la invención (Tabla 3).

55 En realizaciones alternativas, la especificidad se expresa (junto con la sensibilidad) como una medida estadística del rendimiento de un ensayo de clasificación binario, tal como usando una curva de Característica Operadora Receptora (ROC). Para cualquier ensayo, hay habitualmente una compensación entre la especificidad y sensibilidad. Por ejemplo: en ensayos de exploración de cáncer de sujetos humanos, es indeseable arriesgarse a identificar falsamente personas sanas como personas con cáncer (baja especificidad), debido a los altos costes. Estos costes son tanto físicos (procedimientos arriesgados innecesarios) como financieros. Este intercambio puede representarse gráficamente usando una curva de ROC. La "curva de Característica Operadora Receptora" y "curva ROC" se 60 refieren a una representación de la tasa del verdadero positivo (también conocida como sensibilidad) frente a la tasa de verdadero negativo (también conocida como 1-especificidad). El resultado medido del ensayo se representa en el eje x mientras que el eje y representa el número de sujetos de control (por ejemplo, sanos) o casos (por ejemplo, cáncer). Para cualquier punto de corte dado (cada punto a lo largo del eje x), puede medirse una sensibilidad y especificidad del ensayo. El intervalo de sensibilidad y especificidad para cualquier ensayo dado puede variar de 65 0 % a 100 %, dependiendo del punto de corte seleccionado. Por esta razón, en algunas realizaciones preferidas, se usa la ABC como la medida convencional de la especificidad y/o sensibilidad de un ensayo. El "área bajo la curva"

(“ABC”) para la representación de curva ROC es igual a la probabilidad de que un clasificador clasifique un caso positivo elegido al azar más alto que un negativo elegido al azar. Por lo tanto, la ABC es una medida general de la capacidad de un ensayo para diferenciar con éxito entre sujetos de caso (por ejemplo, cáncer) y de control (por ejemplo, sanos). La probabilidad aleatoria generaría una ABC de 0,5. Por lo tanto, en una realización, los ensayos útiles tienen preferentemente ABC mayores de 0,50, incluyendo cualquier valor de 0,51 a 1,00, tal como de 0,55 a 1,00, de 0,60 a 1,00, de 0,65 a 1,00, de 0,70 a 1,00, de 0,75 a 1,00, de 0,80 a 1,00, de 0,85 a 1,00, de 0,90 a 1,00, de 0,95 a 1,00, y más preferentemente 1,00. Los valores de ABC mayores de 0,50 incluyen 0,51, 0,52, 0,52, 0,54, 0,55, 0,56, 0,57, 0,58, 0,59, 0,60, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64, 0,65, 0,66, 0,67, 0,68, 0,69, 0,70, 0,71, 0,72, 0,73, 0,74, 0,75, 0,76, 0,77, 0,78, 0,79, 0,80, 0,81, 0,82, 0,83, 0,84, 0,85, 0,86, 0,87, 0,88, 0,89, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98 y 0,99.

Los anticuerpos y métodos de la invención para su uso (tanto de diagnóstico como terapéutico) son sensibles a enfermedad. La “sensibilidad” de un método y/o una molécula para enfermedad, tal como “sensibilidad para cáncer” que se usa indistintamente con “sensibilidad de cáncer”, se refiere a la proporción (por ejemplo, porcentaje, fracción, etc.) de positivos (es decir, individuos que tienen cáncer) que se identifican correctamente como tales (por ejemplo el porcentaje de personas con cáncer que se identifica que tienen la afección). La sensibilidad puede calcularse de acuerdo con la siguiente ecuación: sensibilidad = número de verdaderos positivos / (número de verdaderos positivos + número de falsos negativos).

Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones y/o los métodos de la invención tienen una “sensibilidad de enfermedad”, tal como una “sensibilidad de cáncer”, mayor de 50 %, incluyendo cualquier valor numérico de 51 % a 100 %, tal como 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 %. Aunque es más deseable una sensibilidad del 100 % (es decir, predecir que todos los sujetos del grupo de cáncer tienen cáncer), no es necesario.

En realizaciones alternativas, las composiciones y/o los métodos de la invención tienen una “sensibilidad a enfermedad”, tal como “sensibilidad a cáncer”, igual a o menor de 50 %, incluyendo cualquier valor numérico de 0 % a 50 %, tal como 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 % y 49 %.

En algunas realizaciones, la sensibilidad se expresa (junto con la especificidad) como una medida estadística del rendimiento de un ensayo de clasificación binario, tal como usando ABC de una curva ROC, como se ha analizado anteriormente con respecto a especificidad.

D. Líneas celulares de hibridoma

Además de los nuevos anticuerpos de la invención, la invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen estos anticuerpos. La “célula de hibridoma” se refiere a una línea celular producida fusionando un linfocito B productor de anticuerpos específicos con una célula de mieloma (cáncer de linfocitos B) que se selecciona por su capacidad para crecer en cultivo tisular y por ausencia de síntesis de cadena de anticuerpo. Los anticuerpos producidos por la célula de hibridoma son todos de una única especificidad y son por lo tanto anticuerpos monoclonales (a diferencia de anticuerpos polyclonales).

La divulgación enseña líneas celulares de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido, o parte antigenica del mismo, seleccionado del grupo que consiste en a) polipéptido de ectodominio de MUC16 (por ejemplo, NFSPLAR RVDRVAIYEE FLRMTRNGTQ LQNFTLDRSS VLVDGYSPNR NEPLTGNSDL P (SEQ ID NO:17)), b) polipéptido de dominio citoplasmático de MUC16 (por ejemplo, VTTRR RKKEGEYNVQ QQ (SEQ ID NO:18)) y c) polipéptido de dominio extracelular de MUC16 que contiene un polipéptido del bucle de cisteína CQVSTFRSVPNRHHTGVDSL (SEQ ID NO: 19). El polipéptido de MUC16 SEQ ID NO: 18 está contenido dentro de VTTRR RKKEGEYNVQ QQ (SEQ ID NO: 20). Por lo tanto, SEQ ID NO: 20 contiene tanto un aminoácido de dominio transmembrana (L) como una parte de dominio citoplasmático VTTRR RKKEGEYNVQ QQ (SEQ ID NO: 18), es decir, la L es opcional, ya que es parte del dominio transmembrana. El polipéptido de MUC16 SEQ ID NO: 18 también está contenido dentro de CGVLVTTRR RKKEGEYNVQ QQ (SEQ ID NO: 03). Por lo tanto, SEQ ID NO: 03 contiene tanto una parte de dominio transmembrana (CGVL) como una parte de dominio citoplasmático VTTRR RKKEGEYNVQ QQ (SEQ ID NO: 18) es decir, la CGVL es opcional, ya que es parte del dominio transmembrana.

E. Conjugados de los anticuerpos de la invención unidos a agentes citotóxicos y/o profármacos

La invención contempla anticuerpos conjugados. Un anticuerpo “conjugado” se refiere a un anticuerpo de la presente invención unido covalentemente con un agente citotóxico y/o un profármaco de un agente citotóxico.

El "agente citotóxico" se refiere a cualquier agente que sea capaz de reducir el crecimiento de, y/o destruir, una célula diana. Un "profármaco" representa un análogo de un agente citotóxico que carece sustancialmente de actividad citotóxica hasta que se somete a una etapa de activación. Las etapas de activación pueden incluir escisión enzimática, una etapa de activación química tal como exposición a un reductor, o una etapa de activación física tal como fotólisis.

5 El enlace covalente entre los anticuerpos de la invención y el agente citotóxico o profármaco puede incluir enlaces de escisión tales como enlaces disulfuro, que pueden dar como resultado provechosamente escisión de un enlace covalente dentro del ambiente reductor de la célula diana. Dichos conjugados son útiles como agentes terapéuticos específicos de células tumorales.

10 En una realización, el agente citotóxico es una molécula farmacológica pequeña (Payne *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 7.202.346). En otra realización, el agente citotóxico es un maitansinoide, un análogo de un maitansinoide, un profármaco de un maitansinoide o un profármaco de un análogo de un maitansinoide (Patentes de Estados Unidos n.º 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545; 7.202.346). En otra realización, el agente citotóxico puede ser un taxano (véase Patentes de los Estados Unidos n.º 6.340.701 y 6.372.738 y 7.202.346) o análogo de CC-1065 (véase Patentes de Estados Unidos n.º 5.846.545; 5.585.499; 5.475.092 y 7.202.346).

15 En otra realización, el agente citotóxico se ejemplifica por una auristatina, un agente de unión al surco menor de ADN, un agente alquilante del surco menor de ADN, una enediina, una duocarmicina, un maitansinoide y un alcaloide de la vinca (Patente de Estados Unidos n.º 7.662.387).

20 En una realización adicional, el agente citotóxico es un agente anti tubulina (Patente de Estados Unidos n.º 7.662.387). En otra realización más, el agente citotóxico se ejemplifica por dimetilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina-p-fenilendiamina (AFP), dovalina-valina-dolaisoleunina-dolaproína-fenilalanina (MMAF) y monometil auristatina E (MAE) (Patente de Estados Unidos n.º 7.662.387).

25 En una realización adicional el agente tóxico se ejemplifica por radioisótopo que emite radiación, inmunomodulador, lecitina y toxina (Patente de Estados Unidos n.º 6.429.295). En particular, el radioisótopo que emite radiación es un emisor alfa seleccionado del grupo que consiste en ²¹²Bi, ²¹³Bi y ²¹¹At, o un emisor beta seleccionado del grupo que consiste en ¹⁸⁶Re y ⁹⁰Y, o un emisor gamma ¹³¹I (Patente de Estados Unidos n.º 7.666.425).

30 En una realización alternativa, la toxina se ejemplifica por ricina, la cadena A de ricina y proteína antiviral de ombú (Patente de Estados Unidos n.º 5.057.313).

35 En otra realización más, el agente citotóxico es un fármaco antineoplásico seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, 5-fluorouracilo, cicloheximida, daunomicina, doxorubicina, clorambucilo, trenimon, mostaza de fenilendiamina, adriamicina, bleomicina, arabinósido de citosina o ciclofosfamida (Patente de Estados Unidos n.º 5.057.13).

40 F. Detección de partes de Muc16 y aplicaciones de diagnóstico

45 La invención proporciona un método para detectar una enfermedad que comprende sobreexpresión de MUC16 en un sujeto, en el que el método comprende a) proporcionar i) una muestra de un sujeto y ii) uno cualquiera o más de los anticuerpos de la invención, b) poner en contacto la muestra con el anticuerpo en condiciones para la unión específica de anticuerpo con su antígeno afin, y c) detectar un aumento del nivel de unión del anticuerpo con la muestra en comparación con una muestra de control que carece de la enfermedad, detectando de este modo la enfermedad en el sujeto. Se conocen en la técnica métodos genéricos para detectar enfermedad usando anticuerpos (Payne *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 7.202.346). Los métodos de la invención son particularmente útiles en la detección de cáncer, tal como cáncer ovárico y cáncer de mama.

50 Los métodos de la invención no están limitados a un enfoque particular para detectar la unión de los anticuerpos de la invención con sus antígenos. En una realización, la detección de unión con los anticuerpos de la invención normalmente implica usar anticuerpos que están marcados con un resto detectable, tal como radioisótopo (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S y/o ¹²⁵I), compuesto fluorescente o quimioluminiscente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina y/o luciferina) y/o una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa y/o peroxidasa de rábano rusticano).

55 Se conocen en la técnica métodos para conjugar anticuerpos con un resto detectable (por ejemplo, Hunter, *et al.*, Nature 144: 945 (1962); David, *et al.*, Biochemistry 13: 1014 (1974); Pain, *et al.*, J. Immunol. Meth. 40: 219 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30: 407 (1982)).

60 Por lo tanto, los anticuerpos de la invención pueden emplearse en inmunoensayos, tales como ensayos de unión competitivos, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de immunoprecipitación, incluyendo inmunohistoquímica, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y transferencias de Western.

Por ejemplo, con respecto a la detección inmunohistoquímica, los datos del presente documento demuestran que el anticuerpo 4H11 es útil para detectar carcinoma seroso ovárico de alto grado, cáncer lobular (28) y un subconjunto de carcinomas ováricos que son negativos con OC125 y que conservan partes citoplasmáticas y extracelulares de la glucoproteína MUC16.

5 Los anticuerpos de la invención también son útiles para captura de imágenes *in vivo* radiográficas, en la que un anticuerpo marcado con un resto detectable tal como un agente radiopaco o radioisótopo se administra a un sujeto, preferentemente en el torrente sanguíneo, y se ensaya la presencia y localización del anticuerpo marcado en el hospedador. Esta técnica de captura de imágenes es útil en la estadificación y el tratamiento de tumores malignos.

10 Los anticuerpos de la invención son adicionalmente útiles como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica, para capturar y purificar moléculas que contienen antígenos que se unen específicamente a los anticuerpos de la invención.

15 **G. Aplicaciones terapéuticas**

La invención proporciona métodos para tratar una enfermedad que comprende sobreexpresión de MUC16, que comprende administrar a un sujeto que tiene la enfermedad una cantidad terapéuticamente eficaz de uno cualquiera 20 o más de los anticuerpos de la invención. Se conocen en la técnica métodos genéricos para tratar enfermedad con anticuerpos (Payne *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 7.202.346). Los métodos de la invención son particularmente útiles en el tratamiento del cáncer, tal como cáncer de ovárico y cáncer de mama. Estos métodos 25 también son aplicables a cáncer primario, cáncer metastásico y cáncer recurrente.

25 El término "administrar" a un sujeto significa proporcionar una molécula a un sujeto. Esto puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Erickson *et al.*, Patente de Estados Unidos 6.632.979, Furuta *et al.*, Patente de Estados Unidos 6.905.839, Jackobsen *et al.*, Patente de Estados Unidos 6.238.878, Simon *et al.*, Patente de Estados Unidos 5.851.789). Las composiciones de la invención pueden administrarse de forma profiláctica (es decir, antes de la observación de síntomas de la enfermedad) y/o terapéutica (es decir, después de la observación 30 de síntomas de la enfermedad). La administración también puede ser conjunta con (es decir, al mismo tiempo que, o durante) la manifestación de uno o más síntomas de la enfermedad. Además, las composiciones de la invención pueden administrarse antes, conjuntamente con, y/o después de la administración de otro tipo de fármaco o procedimiento terapéutico (por ejemplo, cirugía). Los métodos de administración de las composiciones de la invención 35 incluyen, sin limitación, administración en formas parenteral, oral, intraperitoneal, intranasal, tópica y sublingual. Las vías parenterales de administración incluyen, por ejemplo, vías de inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal e infusión.

40 En una realización, las composiciones de la invención comprenden un lípido para suministro como liposomas. Se conocen en la técnica métodos para generar dichas composiciones (Borghouts *et al.* (2005) J Pept Sci 11, 713-726; Chang *et al.* (2009) PLoS One 4, e4171; Faisal *et al.* (2009) Vaccine 27, 6537-6545; Huwyler *et al.* (2008) Int J Nanomedicine 3, 21-29; Song *et al.* (2008) Int J Pharm 363, 155-161; Voinea *et al.* J Cell Mol Med 6, 465-474).

45 Se conoce en la técnica tratamiento con anticuerpos de seres humanos con cáncer, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.736.137; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; 5.846.545; 7.202.346; 6.340.701; 6.372.738; 7.202.346; 5.846.545; 5.585.499; 5.475.092; 7.202.346; 7.662.387; 7.662.387; 6.429.295; 7.666.425; 5.057.313.

50 Los anticuerpos de la invención pueden administrarse con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) solución salina 0,9 % (NaCl 0,9 % p/v) y (3) dextrosa 5 % (p/v).

55 Los anticuerpos de la invención se administran normalmente en una cantidad terapéutica. Las expresiones "cantidad terapéutica", "cantidad farmacéuticamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad biológicamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a una cantidad que es suficiente para conseguir un resultado deseado, bien cuantitativo o bien cualitativo. En particular, una cantidad farmacéuticamente eficaz es la cantidad que da como resultado la reducción, el retardo y/o la eliminación de efectos 60 indeseables (tales como patológicos, clínicos, bioquímicos y similares) que se asocian con enfermedad. Por ejemplo, una "cantidad terapéutica que reduce el cáncer" es una cantidad que reduce, retarda y/o elimina uno o más síntomas de cáncer.

65 Por ejemplo, las "dosificaciones" específicas de una "cantidad terapéutica" dependerán de la vía de administración, el tipo de sujeto que se trate, y las características físicas del sujeto específico que se considere. Los practicantes expertos en los campos médicos, veterinario y otros relacionados, conocen bien estos factores y su relación para determinar esta cantidad. Esta cantidad y el método de administración pueden adaptarse para conseguir eficacia óptima pero dependerán de factores tales como el peso, la dieta, la medicación simultánea y otros factores, que reconocerán los expertos en la materia. La cantidad y frecuencia de dosificación se seleccionan para crear un nivel

eficaz del compuesto sin efectos sustancialmente perjudiciales.

Cuando está presente en una forma de dosificación acuosa, en lugar de liofilizarse, el anticuerpo normalmente se formulará a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 0,015 a 15 mg de anticuerpo/kg de peso del paciente es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, bien, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o bien mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad.

Los métodos de la presente invención pueden practicarse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Experimental

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Lo siguiente es una descripción breve de los materiales y métodos a modo de ejemplo usados en los Ejemplos posteriores. Algunos anticuerpos descritos se proporcionan como fondo y/o para fines de comparación.

Cultivos celulares:

Se obtuvieron líneas celulares OVCAR3, SKOV3 y A2780 a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se mantuvieron en cultivo de acuerdo con la bibliografía de la ATCC. Para la creación de líneas celulares transfectadas MUC16+, la parte carboxilo terminal del ADNc de MUC16 se introdujo como proteínas de fusión con proteína verde fluorescente usando el sistema de expresión de vector phrGFP Vitality (Stratagene, La Jolla, CA). Se seleccionaron líneas celulares estables usando genética (G418, Invitrogen, Grand Island, NY) en sus medios de cultivo respectivos y se aislaron por expresión de Proteína Verde Fluorescente. Se mantuvieron rutinariamente transfectantes estables en G418 en su medio de cultivo respectivamente. Los transfectantes Δ MUC16^{c114} tienen expresión de superficie celular de proteína MUC16 del sitio de escisión potencial al extremo carboxilo terminal (AA 1776 a 1890) (12).

Preparación monoclonal:

Usando la secuencia de MUC16, se sintetizaron secuencias peptídicas que codificaban elementos de la secuencia de aminoácidos Δ MUC16^{c114} en la instalación central de microquímica del Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering (MSKCC). Los inventores sintetizaron 3 polipéptidos (Figura 1) y modificaron el Polipéptido 1 y el Polipéptido 2 con una cisteína en el extremo N terminal para mejor conjugación con KLH. Se mezclaron concentraciones iguales de los péptidos conjugados con KLH y después se usaron como el inmunógeno para 5 ratones BALB/c. Los inventores seleccionaron 1 de los 5 ratones cuyo suero mostró la mayor reactividad frente a péptidos individuales por ELISA, y la instalación central de anticuerpos monoclonales de MSKCC realizó la fusión y seleccionó los anticuerpos usando protocolos convencionales. Después de 10 días de fusión, los sobrenadantes se seleccionaron y se exploraron con respecto a reactividad por ELISA frente a los péptidos sintéticos individuales.

ELISA:

Se realizó ELISA de tipo sándwich para ver la positividad de los anticuerpos frente a péptidos individuales y proteína de fusión GST- Δ MUC16^{c114} después de protocolo de instalación central rutinaria para el ensayo de ELISA.

Análisis de FACS:

Se retiraron células diana adherentes mediante Tripsina 0,05 % y EDTA 0,1 %, se lavaron y se contaron por un hemocitómetro. Las células se distribuyeron en múltiples tubos Eppendorf con al menos 0,5-1 x 10⁶ células por tubo. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía FCS 1 % y azida sódica 0,025 % (tampón de FACS). Para tinción con FACS interna, las células en los tubos Eppendorf se permeabilizaron con Solución de Permeabilización de FACS 2 diluida 1:10 (BD Bio-Sciences, San Jose, CA) durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron dos veces con tampón de FACS helado. Después se incubaron sin (para el control de anticuerpo secundario) o con 1 μ g/tubo de sobrenadantes biorreactivos de monoclonales MUC16 de ratón durante 30 minutos en hielo. Para tinción de FACS en superficie, las células se incubaron sin (para control de anticuerpo secundario) o con 1 μ g/tubo de sobrenadantes biorreactivos de monoclonales de MUC16 (9B11.20.16, 9C9.21.5.13 y 4H11.2.5), OC125 de ratón antihumano (M3519), M11 de ratón anti humano (M3520)

(DakoCytomation, Dako North America Inc., Carpinteria, CA) o VK8 (proporcionado amablemente por la Dr. Beatrice Yin y el Dr. Ken Lloyd, MSKCC, Nueva York, NY) durante 30 minutos en hielo. Las células en tubos Eppendorf también se tiñeron en superficie con 1 µg/tubo de anticuerpos de control de isótipo coincidente no específicos (13C4 para IgG1 y 4E11 para IgG2b monoclonales obtenidos de la Instalación Central Monoclonal de

5 MSKCC) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Todas las células se lavaron tres veces con tampón de FACS. Las células se incubaron con 1 µg/tubo de anticuerpo secundario de cabra anti IgG1 de ratón-PE o IgG2b-PE durante 30 minutos en hielo y después se lavaron tres veces con tampón de FACS. Las células se analizaron por una máquina FACS Calibur en la instalación central de citometría de flujo de MSKCC.

10 **Análisis de transferencia de Western:**

Se cultivaron líneas celulares estables en placas de 10 cm en sus medios de cultivo respectivos y se incubaron con CO₂ 5 % a 37 °C durante 3 días. Se lavaron dos veces con PBS helado para retirar el medio que contenían suero. Las células adherentes se rasparon con 1-2 ml de PBS helado, y las células se sedimentaron por centrifugación en un tubo Eppendorf a 4 °C en una centrífuga Eppendorf. Se descartó el sobrenadante, y las células se lisaron con 0,2 ml de medio de lisis Ripa modificado (Tris-HCl 20 mM; pH 7,4; NaCl 150 mM; NP-40 1 %; Na3VO4 1 mM; PMSF 1 mM; DTT 1 mM; leupeptina 10 µg/ml; y aprotinina 10 µg/ml) durante 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 4 °C durante 10 minutos. La solución soluble se separó en un tubo y se descartó el sedimento residual. La concentración de proteína se midió usando el Ensayo de Proteína Bio-Rad (BioRaD Laboratories, Hercules, CA). Se separaron 20 cantidades iguales de proteínas (proteína de fusión GST-MUC16-CD o extractos de líneas celulares estables) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa usando un aparato de transferencia BioRad en una cámara frigorífica a 4 °C. Las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovina (BSA) 3 % en PBS con Tween-20 (PBST) 0,1 % a 4 °C durante una noche. Las membranas se exploraron con anticuerpo primario (dilución 1:1000) durante 1 hora a temperatura 25 ambiente y después se lavaron tres veces con PBST. Después las membranas se tiñeron con anticuerpo secundario correspondiente, anticuerpo completo anti IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano rusticano (HRP) de oveja (GE Healthcare, RU) (dilución 1:5000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron tres veces con PBST y se revelaron con un reactivo de quimioluminiscencia Western Lightning® (ECL, Perkin Elmer, Waltham, MA) durante 1-5 minutos a temperatura ambiente, y las señales se revelaron en Película BioMax de Kodak.

30 Estudios de unión e internalización con anticuerpos monoclonales y transfectantes estables OVCAR3 y SKOV3:

35 se marcaron anticuerpos monoclonales purificados con ¹³¹I usando el método de iodogen y se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño (22). Se realizaron estudios de unión de saturación con anticuerpos radiomarcados usando sustratos de células OVCAR-3 intactas. Brevemente, se prepararon 10 soluciones de ensayo (por triplicado) y contenían cantidades crecientes de los anticuerpos radioyodados, 3-500.000 células en un volumen total de 500 µl de PBS (BSA 0,2 %; pH 7,4). Las células se aislaron mediante filtración rápida a través de una membrana de fibra de vidrio y se lavaron con solución salina tamponada con tris helada. Las 40 células se contaron en un contador gamma con patrones de actividad total añadidos. Para cada concentración de anticuerpo radiomarcado, se determinó la unión no específica en presencia de 100 nM del anticuerpo no modificado. Los datos se analizaron con un método de regresión de mínimos cuadráticos (Origen, Microcal, Software Inc., Northampton, MA) para determinar los valores de K_d y B_{máx} y se realizó una transformación de Scatchard.

45 Se realizaron estudios de internalización de células de anticuerpos con anticuerpos monoclonales ¹³¹I-4H11 y ¹³¹I-OC125 y células transfectadas estables SKOV3-phrGFP-ΔMUC16^{c334}. Brevemente, se añadió anticuerpo radiomarcado (370 MBq/mg, 100 kcpm) en 2 ml de medio a células SKOV3 sembradas en una placa de 6 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C durante hasta 24 horas. En diversos puntos temporales, el medio se retiró de tres 50 pocillos y las células se lavaron con 2 x 2 ml de PBS. Después se retiró la actividad unida a superficie celular y se recogió con 2 x 2 ml de un lavado ácido helado (ácido acético 100 mM glicina 100 mM; pH 3,0). Las células se disolvieron después con 2 x 1 ml de NaOH 1 M y se recogieron. Al final del estudio todas las muestras se contaron con un contador gamma junto con patrones, que representaban la cantidad inicial de radioactividad añadida. Todas las muestras de medios se analizaron por ITLC-SG con fases móviles de TCA 5 % para determinar ¹³¹I no unido.

55 **Micromatriz tisular (TMA):**

60 Se construyeron micromatrizes tisulares dentro de la institución de los inventores o se obtuvieron de un laboratorio comercial si no estaban disponibles de forma interna. Brevemente, se obtuvieron biopsias de aguja gruesa de tejido incluido en parafina preexistente de los bloques denominados donadores y después se relocalizaron en un bloque "maestro" dispuesto en parafina receptor usando las técnicas de Kononen *et al.* y modificadas posteriormente por Hedvat *et al* (23-24). Se usó un Dispositivo de Matrices Tisulares MTA-1 operado manualmente de Beecher Instruments Inc. (Sun Prairie, WI) para producir puntos circulares de muestras (núcleos) que median de 0,6 a 1,0 mm de diámetro. Los núcleos se dispusieron de 0,3 a 0,4 mm de separación entre sí. Se dispuso estratégicamente una capa de tejidos de control alrededor de las micromatrizes tisulares en sí mismas para evitar efectos de deshile. La composición específica de cada micromatriz tisular se define posteriormente. Se prepararon 65 portaobjetos de micromatrizes tisulares para cáncer ovárico, cáncer de próstata, adenocarcinoma del pulmón,

neoplasias mucinosas del páncreas y carcinoma de mama invasivo ductal e invasivo lobular cortando secciones de 4 μm de tejido incluido en parafina fijado en formalina. Se obtuvieron micromatrices tisulares adultas y fetales normales de una fuente comercial (Biomax, EE.UU.). Se usaron células OVCAR3 como controles positivos.

5 **Inmunohistoquímica:**

Se realizó inmunohistoquímica en las micromatrices tisulares tanto con OC125 convencional (Ventana, Tuscon, AZ) como con los anticuerpos monoclonales nuevos. Se cortaron secciones de las micromatrices tisulares a 4 micrómetros, se colocaron en portaobjetos de microscopio Superfrost/Plus (Fisher brand) y se hornearon en un horno a 60 °C durante al menos 60 minutos. Los portaobjetos se desparafinizaron después y se hidrataron con agua destilada, se empaparon en tampón citrato a pH 6,00 durante 30 minutos a 97 °C, se lavaron en agua corriente durante 2-5 minutos, se incubaron durante 5 minutos en peróxido de hidrógeno 3 % diluido en agua destilada. Los portaobjetos se lavaron en agua destilada durante 1 minuto, se transfirieron a un baño de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, para dos cambios de 5 minutos cada vez y se colocaron en BSA 0,05 % diluido en PBS durante un mínimo de 1 minuto. Después de secar alrededor de secciones tisulares, se aplicó suero normal a una dilución 1:20 en BSA/PBS 2 % y se incubaron durante un mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente en una cámara de humedad. El suero se extrajo después por succión sin permitir que las secciones se secan, y se colocaron aproximadamente 150 lambda de anticuerpo nuevo a una dilución de 1:1000 en el tejido. El portaobjetos se incubó durante una noche (aproximadamente 15-18 horas) a 4 °C en una cámara de humedad. El anticuerpo primario se retiró por lavado usando tres cambios de PBS durante 10 minutos cada uno. Se aplicó anticuerpo secundario, a ratón biotinilado de Vector laboratories (Burlingame, Ca) a una dilución 1:500 en BSA/PBS 1 % y se incubó durante 45-60 minutos a temperatura ambiente en cámara de humedad. El anticuerpo se retiró de nuevo por lavado usando tres cambios de PBS como anteriormente. Los portaobjetos se transfirieron después a un baño de diaminobenzidina (DAB), y se diluyeron en PBS durante 5-15 minutos. Los portaobjetos se lavaron después en agua del grifo durante 1 minuto, se contratiñeron usando hematoxilina modificada por Harris (Fisher), se descoloraron con alcohol ácido 1 % y azul en agua amoniacial, se deshidrataron con 3 cambios cada uno de etanol 95 %, etanol 100 % y xileno durante 2 minutos cada uno y se taparon con un cubreobjetos con medio de montaje permanente.

30 **Puntuación de inmunohistoquímica:**

35 Los anticuerpos disponibles en el comercio, tales como OC125 y M11, se dirigen a epítopos dependientes de glucosilación complejos. La hipótesis de los inventores es que la glucosilación puede ser específica de tejido; por lo tanto, fue importante examinar la utilidad de los anticuerpos dirigidos a péptidos en tejidos fijados en parafina y estudiar la prevalencia de la expresión de MUC16. Los tres anticuerpos candidatos, 4H11, 9C9 y 4A5, se caracterizaron usando sedimentos de línea celular OVCAR3. De los tres, el anticuerpo 4H11 mostró el patrón de tinción más fuerte, más difuso y uniforme a múltiples diluciones, con la menor cantidad de tinción de fondo y, por lo tanto, se optimizó para su uso en tejidos humanos en la instalación central de patología.

40 Usando 4H11, los inventores tiñeron y puntuaron la positividad usando micromatrices tisulares de carcinomas serosos ováricos de alto grado, de alto estadio, (Figura 2), siendo estos tumores el tipo más común de cáncer ovárico, que representa aproximadamente 80-85 % de todos los carcinomas ováricos en naciones occidentales industrializadas (25). Para ensayar la especificidad del nuevo anticuerpo, los inventores también tiñeron micromatrices tisulares de cánceres de la próstata, pulmón, mama y páncreas y compararon sus intensidades de tinción con la del anticuerpo monoclonal OC125 (Figura 6A-D). Para determinar si habría cualquier reactividad cruzada con tejidos humanos normales, los anticuerpos también se ensayaron en TMA adultos y fetales humanos normales.

50 Un patólogo de referencia revisó todas las secciones teñidas (KJP). Un segundo patólogo (RAS) puntuó también de forma independiente un subconjunto de núcleos para los que había tinción equívoca para asegurar la uniformidad en los métodos de puntuación. Solamente se consideraron positivas la tinción citoplasmática y/o membranosa. Si una parte de la célula mostró tinción membranosa, esta se consideró tinción parcial. Se ideó un sistema de puntuación para proporcionar una evaluación semicuantitativa de distribución e intensidad de tinción en núcleos individuales. Al mismo tiempo, se diseñó para ser útil para comparar la distribución e intensidad de tinción entre OC125 y los nuevos anticuerpos. La puntuación incorporó el porcentaje de células, la intensidad y el patrón de la tinción de acuerdo con los siguientes patrones: puntuación 0: sin tinción; puntuación 1: <5 % fuerte o débil; puntuación 2: 5-50 % fuerte o débil; puntuación 3: 51-75 % fuerte o 51-100 % débil; puntuación 4: 76-99 % fuerte; y puntuación 5: 100 % tinción fuerte (Figura 3). El patólogo revisó en primer lugar todas las micromatrices tisulares teñidas con OC125 y puntuó cada núcleo. Después los mismos núcleos teñidos con los nuevos anticuerpos tuvieron una puntuación de 1 hasta varios días después de OC125 sin referencia a los resultados previos. Se realizó una comparación directa de la puntuación entre las tinciones para cada núcleo solamente después de haberse completado todas las puntuaciones. Se usó el mismo proceso para todas las micromatrices tisulares no ováricas. Después de la comparación, se determinó que la tinción de núcleo era concordante, equívoca o discordante basándose en los diferenciales de puntos. Los núcleos concordantes difirieron en de 0 a 1 punto, los puntos equívocos difirieron en 2 puntos y los puntos discordantes difirieron en de 3 a 5 puntos. La única excepción a esta norma fue cuando la diferencia de 1 punto era entre una puntuación de 0 y 1, en cuyo caso, las diferencias se consideraron equívocas. Esto fue así para separar realmente los casos negativos de los incluso focalmente positivos.

Ejemplo 2

Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti MUC16

- 5 Se hallaron anticuerpos monoclonales dirigidos a MUC16 mediante exploración basada en ELISA usando tanto péptidos individuales como proteína GST- Δ MUC16^{c114} recombinante seguido de subclonación secuencial para clones de células individuales.
- 10 **Tablas 1A y 1B:** anticuerpos monoclonales del extremo carboxilo terminal de MUC16 que muestran su reactividad a western de GST-AMUC16^{c114}, análisis de FACS y células de tipo silvestre OVCAR3

Tabla 1A

ELISA Hibridoma a Sob (1:1)	Péptido 1 (1:10) GST- MucCD Western +/-	ELISA Hibridoma a Sob (1:1)		Péptido 2 (1:10) GST- MucCD Western +/-		ELISA Hibridoma a Sob (1:1)		Péptido 3 (1:10)GST- MucCD Western +/-	
		OVCA FACS +/-	Isotipo	OVCA FACS +/-	Isotipo	OVCA FACS +/-	Isotipo	OVCA FACS +/-	Isotipo
10A2	+	-	IgG1, IgM	13H1	Débil	-	IgG1	22E10	+
23D4	-	-	ausente	28F8	+	+	IgG1, IgM	22F11	Débil
2F4	Débil	-	IgG1, IgM	11B6	-	-	IgM	19G4	Débil
9B11	Débil	+-	IgG1	4C7	+	-	IgM	31A3	Débil
23D3	Débil	+	IgG1, IgG2b	28F7	+	+	IgM	4C2	+
30B1	-	-	IgG1	9C7	+	+		27G4	+
31B2	+	-	IgM	9C9	+	+	IgG1, IgG2b	19D1	+
				4H11	+	+	IgG2b, IgM	22F1	+
				4A2	-	-	IgG1	4D7	+
				4A5	+	+	IgG1	9A5	-
				29G9	+	-	IgG1	31C8	-
				5C2	+	+	IgG1	6H2	Débil
				23G12	-	-	IgG1, IgG2a	10F6	-
				25G4	-	-	IgG1, IgM	3H8	+
				26B2	+	+	IgG1, IgG2b, IgM	24G12	-
				25H3	-	-	IgG1, IgM		
Tabla 1B									
Péptido 1									
Péptido 2									
Péptido 3									
9B11.20.16	+/-	IgG1	9C9.21.5.13	+	IgG2b	31A3.5.1	-	IgG1	

	4H11.2.5	+	IgG2b
	9C7.6	+	IgG1
	5C2.17	+	
	4A5.37	+	IgG1
	28F7.18.10	+	IgG1

Tabla 2: anticuerpos específicos para partes a modo de ejemplo de MUC16

1. Polipéptido 1 de Muc16:

14394	14410	(secuencia de MUC16) 17aa
NFSPLARRVDRVAIYEE (SEQ ID NO:01)		

Son monoclonales de ratón que son específicos para este péptido:

9B11.20.16 (IgG1)
10A2 (IgG1, IgM)
2F4 (IgG1, IgM)
23D3 (IgG1, IgG2b)
30B1 (IgG1)
31B2 (IgM)

5

2. Polipéptido 2 de Muc16:

14425	14442	(secuencia de MUC16) 18aa
TLDRSSVLVDGYSPNRNE (SEQ ID NO:02)		

Son monoclonales de ratón que son específicos para este péptido:

4H11.2.5 (IgG2b)	13H1 (IgG1)	29Q9 (IgG1)
9C9.21.5.13 (IgG2b)	28F8 (IgG1, IgM)	23G12 (IgG1, IgG2a)
9C7.6 (IgG1)	11B6 (IgM)	25G4 (IgG1, IgM)
5C2.17 (IgG1)	4C7 (IgG1)	26B2 (IgG1, IgG2b, IgM)
4A5.37 (IgG1)	4A2 (IgG1)	25H3 (IgG1, IgM)
28F7.38.10 (IgG1)		

10

3. Polipéptido 3 de Muc16 (SEQ ID NO: 03)

14472	14492	(secuencia de MUC16) 21aa
CGVLVTTTRRKKEGEYNVQQQ		

Son monoclonales de ratón que son específicos para este péptido:

31A3.5.1 (IgG1)	19D1 (IgG2b)	10F6 (IgG1)
22E10 (IgG2b)	22F1 (IgG2b, IgM)	3H8 (IgG1, IgM)
22F11 (IgM)	4D7 (IgG3)	24G12 (IgG1, IgM)
19G4 (IgG1, IgM)	9A5 (IgM)	
4C2 (IgG1, IgM)	31C8 (IgG2b)	
27G4 (IgM)	6H2 (IgG1, IgM)	

14452	14475	
FWAVILIGLAGLLGLITCLICGVL (SEQ ID NO:14) es región transmembrana 24aa		

4. Polipéptido 4 de Muc16 (SEQ ID NO: 15) que contiene un polipéptido de bucle de cisteína (SEQ ID NO:19) 14367 14398 (secuencia de MUC16)
32aa

KSYTFSDCOVSITERSUPNRMHHTGQVLDLQSYEPL (SEQ ID NO:15)		
[9 + 8]

Son monoclonales de ratón que son específicos para este péptido:

2MB3 (IgM)

9C7 (IgM)

4F12	IgM kappa
6H6	IgM kappa
25C2	IgM kappa
6E8	IgM kappa
2A3	IgM, IgG1, IgG2b, kappa
2G4	IgM, IgG1, kappa
4C8	IgM, kappa
2A6	IgG1 kappa
24G12	IgG1 kappa
15D5	IgG1 kappa
6E2	IgM, IgG1, IgG3, IgG2a, kappa
7E6	IgM, kappa, lambda
7G11	IgM kappa
20C9	IgG1, IgG2b
9A3	IgM kappa
15B6	IgM kappa
19O3	IgM kappa
5H8	IgM, IgG1, IgG2b, kappa
24A12	IgM kappa
2D10	IgG3, IgM kappa
5B2	IgM, IgG3, IgG2b, IgG2a, IgG1, kappa
8B6	IgG2a, IgG3, kappa
5A11	IgM, kappa
7D11	light kappa only
9F10	IgM, kappa
15D10	IgM, kappa
18D2	IgM, kappa
13A11	IgM, kappa

1A9	IgM, kappa
3B2	IgM, kappa
24F6	IgM, kappa
24E4	IgM, kappa
5A1	IgG2a, IgM, kappa
7B9	IgM, kappa
22F4	IgM, kappa

Los anticuerpos monoclonales identificados se enumeran en la Tabla 1A y Tabla 2. Cada uno de los anticuerpos monoclonales seleccionados era reactivo contra GST-ΔMUC16^{c114}. Los anticuerpos dirigidos contra MUC16 comerciales (OC125, M11 o VK8) no se unieron con GST-ΔMUC16^{c114} en ELISA o transferencia de Western. Los clones se ensayaron en FACS frente a células de cáncer ovárico OVCAR3 y en análisis de transferencia de Western frente a GST-ΔMUC16^{c114} (Tabla 1B), y se aislaron anticuerpos monoclonales purificados seleccionados.

5 Los inventores usaron las células OVCAR3 de tipo silvestre y SKOV3 transducidas con phrGFP-4MUC16^{c114} para caracterizar los anticuerpos seleccionados por análisis de FACS. Todos los anticuerpos monoclonales seleccionados se unieron a ambas líneas celulares mientras que los anticuerpos VK8, M11 y OC125 comerciales se unieron con las células OVCAR3 pero no con la línea celular SKOV3-phrGFP-ΔMUC16^{c114}. Los anticuerpos contra el Polipéptido 3 requirieron permeabilización ya que es un epítopo interno (Figura 7).

10 15 El análisis de transferencia de Western usando la proteína purificada GST-ΔMUC16^{c114} mostró fuerte unión con los anticuerpos 4H11 y 9C9 (Figura 4A), mientras que los otros anticuerpos seleccionados mostraron menos unión. El transfectante SKOV3-phrGFP-ΔMUC16^{c114} también fue positivo por análisis de transferencia de Western usando anticuerpos 4H11 y 9C9 (Figura 4B). Como anteriormente, los anticuerpos comerciales no interaccionaron con la proteína purificada GST-ΔMUC16^{c114} o lisados celulares de la línea celular SKOV3-phrGFP-ΔMUC16^{c114}.

20 25 30 35 Se examinó la unión de seis anticuerpos monoclonales contra OVCAR3 MUC16 en estudios de unión de afinidad. Tres anticuerpos, 9C7, 5C2 y 28F7, mostraron solamente niveles modestos de unión en comparación con la unión no específica de estos anticuerpos con las células OVCAR3, que portan grandes números de sitios de unión a MUC16. Por el contrario, los anticuerpos monoclonales 4H11, 9C9 y 4A5 mostraron afinidad de unión altamente específica, como se muestra en la Figura 5A, con afinidades de unión de 6,8-8,6 nM contra los epítopos de superficie celular de células OVCAR3. Los inventores también examinaron la internalización de anticuerpo unido a proteína MUC16 de superficie celular. Los inventores examinaron la internalización en la línea celular SKOV3-phrGFP-4MUC16^{c334} transfectada que porta el extremo carboxilo terminal de MUC16, incluyendo el epítopo de 4H11 y una única secuencia de repetición en tandem degradada para interaccionar con el anticuerpo OC125. Los anticuerpos comerciales OC125, M11 y VK8 se unen todos a la superficie celular de esta línea celular transducida. El 4H11 marcado con ¹³¹I mostró rápida internalización a un alto nivel, mientras que el anticuerpo OC125 marcado con ¹³¹I se internalizó a una tasa mucho menor (Figura 5B).

Ejemplo 3

35 Resultados de inmunohistoquímica:

Dadas sus afinidades de unión altamente específicas, los anticuerpos 9C9, 4A5 y 4H11 se caracterizaron por utilidad en inmunohistoquímica usando líneas celulares OVCAR3. De los tres, el anticuerpo 4H11 se seleccionó para optimizar para su uso en tejidos humanos basándose en su patrón de tinción robusto, sensible y específico en comparación con los otros dos anticuerpos.

A. Ovario

40 45 Se tiñeron portaobjetos de micromatrizes tisulares de carcinoma seroso ovárico de alto grado, de alto estadio, compuestos de 419 núcleos, que representaban tumores primarios, metastásicos y recurrentes de 40 pacientes con anticuerpos monoclonales tanto OC125 como 4H11 (Figura 2). Las micromatrizes tisulares de OC125 mostraron 279 (66 %) núcleos con tinción 3-5, 99 (24 %) con tinción 1-2 y 41 (10 %) sin tinción. Las micromatrizes tisulares de 4H11 mostraron 236 (56 %) con tinción 3-5, 91 (22 %) con tinción 1-2 y 92 (22 %) sin tinción. Los dos anticuerpos fueron concordantes en 233 núcleos (56 %), equivocados en 161 (38 %) y discordantes en 25 (6 %). De los 25 núcleos

discordantes, 12 (48 % de los casos discordantes, 3 % de todos los casos) mostraron mayor positividad de 4H11 que OC125. Nueve eran discordantes por una diferencia de 4 puntos y 3 eran discordantes por una diferencia de 5 puntos. Hubo un total de 186 núcleos discordantes y equívocos juntos, 48 (26 %) de los cuales mostraron mayor tinción con 4H11 que OC125. El patrón de tinción tanto de 4H11 como de OC125 fue citoplasmático y membranoso, 5 aunque el patrón membranoso de OC125 fue más fuerte y mejor definido que 4H11 en la mayoría de los casos. Los casos discordantes demostraron mayores niveles de 4H11 que otros casos.

B. Cáncer de mama

10 También se examinó otros diversos tejidos con respecto a tinción de 4H11 para ensayar la especificidad del anticuerpo. De los 50 núcleos de carcinomas ductales invasivos de mama (número de pacientes no disponibles), solamente 2 (4 %) mostraron una puntuación de 4 o mayor tinción de 4H11 y ninguno tuvo puntuaciones de 3-5 para tinción de OC125. El patrón de tinción con OC125 fue principalmente apical/luminal con algo de tinción 15 citoplasmática granular. Algunos tumores con lúmina intracitoplasmática también captaron la tinción de OC125. 4H11 mostró un rubor citoplasmático más difuso sin acentuación membranosa.

20 Por el contrario, la micromatriz tisular de carcinoma de mama lobular invasivo (compuesta de 179 núcleos con tumor viable, número de pacientes no disponible) tuvo tinción de MUC16 frecuente con 4H11. En esta micromatriz tisular, 168 núcleos (94 %) no mostraron tinción para OC125, 5 (3 %) mostraron tinción 1-2 y solamente 6 (3 %) mostraron una intensidad de tinción de 3. La tinción de 4H11 fue diferente en su patrón de distribución, no mostrando 49 (27 %) ninguna tinción, mostrando 81 (45 %) tinción 1-2 y mostrando 49 (27 %) tinción 3-4. Ni OC125 ni 4H11 tuvieron núcleos con una intensidad de tinción de 5. El patrón de tinción fue citoplasmático, luminal/membranoso o intraluminal tanto para OC125 como para 4H11. El patrón intraluminal fue fuerte e intenso para ambas tinciones y 25 destacó el lumen intracitoplasmático que está habitualmente presente en carcinomas lobulares. Las tasas de concordancia fueron 34 % concordantes, 43 % equívocas y 23 % discordantes. De los casos equívocos y discordantes, no hubo ninguno en el que el OC125 fuera mayor que el 4H11. Los 42 casos discordantes y 76 de 77 casos equívocos tuvieron 4H11 mayor que OC125. También hubo tinción luminal focal con 4H11 en conductos de mama benignos y carcinoma lobular in situ.

30 C. Adenocarcinomas de pulmón, pancreáticos y prostáticos

35 Los tumores de otros órganos no eran reactivos con ninguno de los anticuerpos. El adenocarcinoma de pulmón TMA tuvo 237 núcleos de 86 pacientes que contenían tumor viable. En el TMA pancreático hubo 92 núcleos de 21 pacientes que contenían tumores mucinosos pancreáticos, incluyendo neoplasias mucinosas papilares intraductales (IPMN) y carcinomas ductales invasivos. En el cáncer de próstata TMA hubo 169 núcleos (número de pacientes no disponible). Ninguna de estas micromatrices tisulares de cáncer tuvo unión significativa con OC125 o 4H11. Esta información se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Intensidad de tinción de OC125 en comparación con 4H11 en micromatrices tisulares

Sitio	Puntuación de intensidad de tinción de OC125 frente a 4H11 (%)					
	0		1-2		3-5	
	OC125	4H11	OC125	4H11	OC125	4H11
Seroso de alto grado de ovario	10	28	24	22	66	56
Ductal invasivo de mama	68	78	32	18	0	4
Lobular invasivo de mama	94	27	3	45	3	27
Adenocarcinoma de pulmón	63	77	24	18	13	5
Neoplasias mucinosas de páncreas	98	88	2	10	0	2
Adenocarcinoma de próstata	0	0	0	0	0	0

Puntuación 0: 0 % de tinción; 1: <5 % fuerte o débil; 2: 5-50 % fuerte o débil; 3: 51-75 % fuerte o 51-100 % débil; 4: 76-99 % fuerte; 5: 100 % fuerte

40 D. Tejidos normales

45 No hubo ninguna tinción con OC125 o 4H11 en colon adulto normal, recto, hocico de tenca, intestino delgado, ovario, hígado, conductos pancreáticos, bazo, riñón y piel. OC125 y 4H11 tuvieron ambos glándulas del canal del cuello uterino (OC125 luminal, 4H11 débil citoplasmática), glándulas esofágicas (luminal), epitelio bronquial (OC125 luminal, 4H11 gránulos intracitoplasmáticos) y corpúsculos tímicos (citoplasmático). 4H11 demostró tinción de débil a moderada de las glándulas gástricas, particularmente en las criptas, con un patrón granular intracitoplasmático. Otros órganos que mostraron tinción intracitoplasmática puntuada con 4H11 fueron solamente próstata, túbulos

seminíferos de los testículos y las células de los islotes del páncreas. La tinción en las células de islotes pancreáticos fue particularmente fuerte y uniforme. También hubo tinción no específica del hígado, riñón y cerebro con 4H11. No hubo ningún caso que se tiñera con OC125 y no con 4H11.

- 5 De forma similar, no hubo tinción con OC125 o 4H11 en corazón fetal, vesícula biliar, colon, intestino delgado, hígado, recto, glándula adrenal, tiroides, bazo, piel, hueso, epidídimos, cerebro, pulmón, músculo, músculo liso, riñón, ojo, cordón umbilical y placenta. OC125 solamente tiñó corpúsculos tímicos en un patrón similar al del tejido adulto. 4H11 tiñó tanto células endocrinas pancreáticas fetales como glándulas del canal del cuello uterino en un patrón similar al de sus homólogos adultos. Las células de islotes mostraron un patrón citoplasmático granular y las glándulas del canal del cuello uterino mostraron un patrón luminal lineal, que fue más similar al patrón de OC125 en el tejido adulto.
- 10

Ejemplo 4

- 15 **Erradicación exitosa de tumores ováricos peritoneales establecidos en ratones Beige SCID después de transferencia adoptiva de linfocitos T genéticamente dirigidas al antígeno MUC16.**

20 **Fin:** la mayoría de los pacientes a los que se diagnostica cáncer ovárico morirán en última instancia de su enfermedad. Por esta razón, son necesarios enfoques nuevos para el tratamiento de este tumor maligno. La transferencia adoptiva de los linfocitos T propios de un paciente, genéticamente modificados *ex vivo* mediante la introducción de un gen que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de linfocitos T artificial, dirigido a un antígeno asociado a tumor, es un enfoque nuevo y prometedor para terapia de cáncer aplicable al tratamiento de cáncer ovárico.

- 25 **Diseño experimental:** se han generado varios CAR dirigidos al dominio extracelular conservado de MUC16, denominado MUC-CD, un antígeno altamente expresado en una mayoría de carcinomas ováricos. Se investiga la biología *in vitro* de linfocitos T humanos transducidos por retrovirus para expresar estos CAR por ensayos de cocultivo en células presentadoras de antígenos artificiales (AAPC) generadas a partir de fibroblastos NIH3T3 modificados genéticamente para expresar el antígeno de MUC-CD diana, así como por ensayos de citotoxicidad que utilizan la línea celular de tumor ovárico OV-CAR3(MUC-CD) humana y células tumorales de paciente primario. Finalmente, se evaluó la eficacia antitumoral *in vivo* de linfocitos T dirigidos por MUC-CD en un modelo tumoral murino de OV-CAR3(MUC-CD) xenogénico, ortotópico, de ratones Beige SCID.

35 Se exponen secuencias a modo de ejemplo usadas en este trabajo en las Figuras 17-19.

- 40 **Resultados:** Los linfocitos T dirigidos a MUC-CD modificados por CAR derivados tanto de donantes sanos como de pacientes con cáncer ovárico mostraron actividad citolítica *in vitro* eficaz contra líneas celulares ováricas humanas así como células de carcinoma ovárico primario. Los linfocitos T dirigidos a MUC-CD pueden expandirse adicionalmente *ex vivo* mediante múltiples ciclos de cocultivo en AAPC 3T3(MUC-CD/B7.1). Los linfocitos T dirigidos a MUC-CD expandidos infundidos en ratones Beige SCID que portaban tumores OV-CAR3(MUC-CD) humanos intraperitoneales retardaron la progresión o erradicaron completamente el tumor incluso en la situación de enfermedad avanzada.

45 **Conclusión:** Estos estudios preclínicos prometedores justifican adicionalmente la investigación de linfocitos T diana MUC-CD como un enfoque terapéutico potencial en la situación clínica tratando a pacientes con carcinomas ováricos MUC-16⁺ de alto riesgo.

Introducción

50 El cáncer ovárico es el sexto cáncer más común en todo el mundo y la séptima causa principal de muertes relacionadas con cáncer en mujeres (1, 2). A pesar de terapia de multimodalidad con cirugía y quimioterapia, la mayoría de los pacientes con carcinomas ováricos tienen un mal pronóstico. Por esta razón, se necesitan con urgencia enfoques alternativos para tratar esta enfermedad.

- 55 La infusión de los linfocitos T del propio paciente dirigidos genéticamente *ex vivo* a antígenos expresados en la superficie de células tumorales es un nuevo enfoque prometedor para la inmunoterapia adoptiva de cáncer, y uno que solamente se ha explorado recientemente en profundidad en la situación clínica. Los linfocitos T pueden modificarse genéticamente para dirigirse a antígenos asociados a tumores mediante la introducción retroviral de genes que codifican receptores de linfocitos T artificiales denominados receptores de antígenos quiméricos (CAR).
- 60 La ingeniería genética de linfocitos T para expresar receptores de linfocitos T artificiales que dirigen citotoxicidad hacia una célula tumoral presenta un medio para potenciar el reconocimiento inmunitario y la eliminación de células cancerosas. Los CAR están compuestos más habitualmente por un anticuerpo monoclonal murino que se dirige a un antígeno asociado a tumor dado, fusionado con un dominio transmembrana (normalmente CD8, CD28, OX-40 y 4-1BB), fusionado con el dominio de señalización citoplasmática de cadena ζ de TCR (3-13). Cuando se usan para reprogramar la especificidad de linfocitos T, estos receptores de fusión permiten el reconocimiento de antígeno nativo. Cuando se

expresa por los linfocitos T, la construcción resultante tras su interacción con el antígeno diana, induce activación de linfocitos T, proliferación y lisis de células diana. Estos receptores de fusión transducen una señal coestimulante dependiente de antígeno funcional en linfocitos T primarios, permitiendo proliferación de linfocitos T sostenida cuando interaccionaron tanto TCR endógenos como un receptor quimérico para señalización estimulante. Hasta la fecha, los estudios preclínicos que utilizan linfocitos T modificados por CAR han demostrado resultados prometedores en una amplia diversidad de tumores malignos (3, 4, 11, 14-18). Más recientemente este enfoque se ha investigado clínicamente en forma de ensayos de fase I (6, 19-21). Estos enfoques genéticos ofrecen un medio para potenciar el reconocimiento inmunitario y eliminación de células cancerosas.

10 Los carcinomas ováricos parecen ser tumores relativamente inmunogénicos capaces de inducir una respuesta inmunitaria endógena basándose en el hecho de que el pronóstico a largo plazo de los pacientes está notablemente influido por el grado y calidad de la respuesta inmunitaria endógena al tumor. Específicamente, se ha documentado bien que la presencia de linfocitos T efectores endógenos dentro del microambiente tumoral de cáncer ovárico se correlaciona directamente con supervivencia de pacientes prolongada (22-25). Por el contrario, números crecientes de linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25^{hi} supresores inmunitarios (Treg) dentro del tumor, que a su vez anulan supuestamente la actividad antitumoral de linfocitos T efectores de infiltración, se correlacionan con supervivencia del paciente más corta (26-29). De hecho, parece que es la relación de Treg con respecto a linfocitos T efectores dentro del microambiente tumoral lo que en última instancia dicta si la respuesta inmunitaria endógena al cáncer es beneficiosa o perjudicial para el paciente (24, 28). En esta situación, la capacidad de generar y expandir posteriormente una población de linfocitos T efectores dirigidos a tumor *ex vivo* que se infunden posteriormente de vuelta al paciente, puede a su vez desplazar la relación de Treg con respecto a linfocitos T efectores a una más favorable para erradicar la enfermedad.

15 Las mucinas son biomoléculas importantes para la homeostasis celular y la protección de superficies epiteliales. Los cambios en la expresión de mucinas en cáncer ovárico podrían aprovecharse en diagnóstico, pronóstico y tratamiento (1). MUC16 es una de dichas mucinas que se sobreexpresa en la mayoría de carcinomas ováricos y es un marcador de suero sustituto establecido (CA-125) para la detección y progresión de cánceres ováricos (30-33). MUC16 es una mucina altamente glucosilada compuesta de un dominio escindido y liberado grande, denominado CA-125, que consiste en múltiples secuencias repetidas, y un dominio conservado (MUC-CD) que incluye un fragmento extracelular no repetido residual, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (34). Ya que el antígeno se expresa de otro modo solamente a niveles bajos en el útero, endometrio, trompas de Falopio, ovarios y serosa de las cavidades abdominal y torácica, MUC16 es una diana potencialmente atractiva para terapias basadas en inmunidad.

20 30 Sin embargo, el hecho de que la mayoría del dominio extracelular de MUC16 se escinde y secreta limita la utilidad de MUC16 como un antígeno diana en carcinomas ováricos. De hecho, hasta la fecha, todos los MAb presentados para MUC16 se unen a epítopos presentes en la fracción de CA-125 secretada grande de la glucoproteína, sin saberse que ninguno se une con la fracción extracelular conservada (MUC-CD) del antígeno (35-37). Ya que la fracción de MUC-CD del antígeno está conservada en la superficie celular, la generación de linfocitos T específicos para esta parte de MUC16 puede superar en gran medida la limitación de MUC16 como una diana para inmunoterapia celular adoptiva. Para este fin, se ha generado previamente una serie de MAb murinos específicos para el dominio extracelular de MUC-CD conservado (38). Utilizando un hibridoma que expresa uno de dichos MAb, 4H11, se han construido con éxito varios CAR específicos para el antígeno MUC-CD. La presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un receptor de linfocitos T quimérico, compuesto de, al menos una cadena zeta, una región de señalización y un elemento de unión que interacciona específicamente con una diana seleccionada así como el receptor de linfocitos T quimérico que comprende una parte de cadena zeta, una región de señalización y un elemento de unión.

25 35 En este informe, se demuestra la transducción retroviral altamente eficaz de estos CAR dirigidos a MUC-CD en linfocitos T humanos con linfocitos T resultantes capaces de dirigir específicamente y lisar células tumorales MUC-CD⁺ *in vitro*. Además, se demuestra la expansión de linfocitos T dirigidos a MUC-CD eficaz *in vitro* mediante cocultivo repetido en fibroblastos NIH (3T3) modificados genéticamente para expresar MUC-CD y el ligando coestimulante B7.1 (CD80). La expansión exitosa de linfocitos T modificados permitió a los inventores generar posteriormente suficientes números de linfocitos T para realizar estudios *in vivo* en ratones Beige SCID inmunocomprometidos que portaban tumores ováricos humanos MUC-CD⁺ intraperitoneales establecidos. Significativamente, en estos estudios se demostró eficacia antitumoral notable de linfocitos T dirigidos a MUC-CD, tanto después de inyección intraperitoneal directa como después de inyección intravenosa en comparación con ratones no tratados, o ratones tratados con linfocitos T que portaban un CAR dirigido a un antígeno irrelevante. Además, se demostró citotoxicidad significativa de linfocitos T de pacientes 4H11-28z⁺ y linfocitos T de donantes sanos que se dirigían a células de carcinoma ovárico derivado de líquido ascítico primario de pacientes de cáncer.

40 45 50 55 60 65 En el conocimiento de los inventores, este es el primer informe en el que linfocitos T genéticamente dirigidos al antígeno MUC16 demuestran eficacia antitumoral notable contra tumores MUC16⁺ bien *in vitro* o bien *in vivo*. Estos datos sirven como una justificación para proponer ensayos clínicos futuros utilizando este enfoque en pacientes con carcinomas ováricos de alto riesgo.

Materiales y métodos

Líneas celulares y linfocitos T

- 5 La línea celular tumoral OV-CAR3 se cultivó en RPMI 1640 (Invitrogen, Grand Island, NY) complementado con FBS inactivado por calor al 10 %, aminoácidos no esenciales, tampón de HEPES, piruvato y BME (Invitrogen). Las líneas celulares productoras retrovirales PG13 y gpg29 se cultivaron en DMEM (Invitrogen) complementado con FCS al 10 % y células presentadoras de antígenos artificiales (AAPC) NIH-3T3, previamente descritas (3), se cultivaron en DMEM complementado con suero de ternero donante inactivado por calor al 10 %. Se obtuvieron linfocitos T de 10 sangre periférica de donantes sanos con el protocolo aprobado por IRB n.º 95-054, en tubos BD Vacutainer CPT (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) según las instrucciones del fabricante. Todos los medios se complementaron con L-glutamina 2 mmol/l (Invitrogen), penicilina 100 unidades/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Invitrogen). Se cultivaron linfocitos T en medio RPMI 1640 como anteriormente complementados con IL-2 20 UI/ml (Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ) y donde se indique, el medio se complementó con interleucina 15 10 ng/ml (R & D Systems, Minneapolis, MN).

Aislamiento de células de cáncer derivadas de líquido ascítico de pacientes

- 20 Se obtuvieron células de cáncer derivadas de líquido ascítico humano primario de pacientes con cáncer ovárico que se sometieron a cirugía para carcinoma ovárico seroso avanzado de nuevo diagnóstico con el protocolo aprobado por IRB n.º 97-134. Las células tumorales se aislaron del líquido ascítico de pacientes por centrifugación a 600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS 1x y se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con FBS 10 % para análisis futuro.

Generación de los CAR 4H11z y 4H11-28z dirigidos a MUC-CD

- 25 Las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal 4H11 derivaron de la línea celular de hibridoma 4H11. Utilizando ADNc generado a partir de ARN de 4H11 se aisló la región codificante de VH por PCR RACE utilizando cebadores modificados como se ha descrito en otra parte (39, 40). La región variable de cadena VL 30 se clonó por PCR convencional utilizando cebadores modificados como se describe en Orlandi *et al* (41, 42). Los fragmentos VH y VL resultantes se subclonaron en el vector de clonación TopoTA PCR 2.1 (Invitrogen) y se secuenciaron. Los fragmentos VH y VL se ligaron posteriormente a un dominio espaciador (Gly4Ser)₃, generando el scFv 4H11 y se fusionaron con el péptido líder CD8 humano (CD8L) por PCR solapante (9, 41). Para construir los CAR 4H11 dirigidos a MUC-CD, se fusionó la región codificante del scFv CD8L-4H11 con los dominios bisagra y 35 transmembrana de CD8 humano (para generar el CAR 4H11z), o como alternativa con los dominios de señalización citoplasmático y transmembrana de CD28 (para generar el CAR 4H11-28z), fusionados con el dominio de señalización CD3-ζ de receptor de linfocitos T (3, 9, 43). Las construcciones de CAR resultantes se subclonaron posteriormente en el vector retroviral de MMLV SFG (44). Se usaron sobrenadantes retrovirales seudotipificados VSV-G derivados de fibroblastos gpg29 transducidos para construir líneas celulares productoras de retrovirus 40 seudotipificadas por envoltura de virus de leucemia de gíbón (GaLV) PG13 estables (41).

Transferencia de genes retrovirales

- 45 Se activaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos aisladas con fitohemaglutinina (PHA) a 2 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO) y se transdujeron por retrovirus en placas de cultivo no tisular recubiertas con retronectina (45). Brevemente, se recubrieron placas de cultivo sin tejido de seis pocillos (BD Biosciences, San Jose, CA) con RetroNectina (RN) (Takara Biomedicals, Otsu, Japón) según las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la activación de PHA, se colocaron alicuotas de 1x10⁶ linfocitos T en 1 ml de medio RPMI complementado en cada pocillo de placas recubiertas con RN, junto con 1 ml de sobrenadante retroviral de SFG. Se centrifugaron linfocitos T diariamente durante 3 días consecutivos con sobrenadante retroviral nuevo añadido diariamente a 2000 g a 30 °C durante 1 h (45). Se evaluó la transferencia génica el día 7 por FACS.

- 55 Para generar las células presentadoras de antígenos artificiales de fibroblastos murinos NIH-3T3 relevantes, se subclonó inicialmente una construcción de MUC-CD que codificaba los dominios extracelular, transmembrana y citoplasmático conservados del antígeno MUC-16 en vector retroviral SFG, SFG(MUC-CD). Se generaron AAPC 3T3(MUC-CD) mediante transducción retroviral de SFG(MUC-CD) en fibroblastos NIH-3T3 de tipo silvestre, mientras que se generaron AAPC 3T3(MUC-CD/B7.1) mediante transducción retroviral de fibroblastos 3T3(B7.1) previamente establecidos (41, 46). Se aislaron líneas celulares altamente enriquecidas por FACS.

- 60 Para generar las líneas celulares OV-CAR3(MUC-CD) y OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc), se transdujeron por retrovirus la línea celular de cáncer ovárico humano OV-CAR3 WT con SFG(GFP-FFLuc) como se ha descrito previamente (47) y/o sobrenadantes retrovirales seudotipificados VSV-G SFG(MUC-CD) derivados de fibroblastos gpg29 como se ha descrito en otra parte (44). Las células tumorales resultantes se clasificaron por FACS para expresión de MUC-CD solamente para la línea celular OVCAR3(MUC-CD) o expresión de MUC-CD y GFP doble para la línea celular OVCAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc). La expresión de MUC-CD por FACS se evaluó usando MAb 4H11.

Análisis in vitro de linfocitos T humanos CAR⁺

Para evaluar la expansión *in vitro* y liberación de citocinas tras estimulación, se cocultivaron linfocitos T transducidos durante 7 días después de la transducción retroviral en placas de cultivo tisular de 6 pocillos (BD Biosciences) en 5 AAPC NIH 3T3 confluentes en medio RPMI complementado con FBS 10 % en ausencia de citocinas complementadas. Para generar suficientes números de linfocitos T modificados por CAR para estudios *in vivo*, se cocultivaron linfocitos T transducidos en B7.1+AAPC (3T3(MUC-CD/B7.1)) en medio RPMI complementado con 20 UI de IL-2/ml y 10 ng/ml de IL-15 como se ha descrito previamente (3, 43). Se activaron linfocitos T de pacientes y 10 se expandieron con perlas CD3/CD28 humanas (DYNAL®, Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis de transferencia de Western de expresión de CAR

15 Se realizó análisis de transferencia de Western de lisados de linfocitos T en condiciones reductoras con 0,1 moles/l de DTT (Sigma) como se ha descrito previamente (46). Brevemente, se lavaron linfocitos T transducidos en PBS y se resuspendieron en tampón de ensayo de radioimmunoprecipitación (RIPA) (Boston BioProducts, Worcester, MA) con inhibidor de proteasa completo mini según las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN). Las proteínas resultantes se separaron en mini geles de SDS-PAGE 12 % (Bio-Rad, Hercules, CA) después de la adición de tampón de carga reductor 6X (Boston BioProducts, Worcester, MA) y calentamiento a 100 °C durante 10 20 minutos. Las proteínas separadas se transfirieron posteriormente a membranas Immobilon y se exploraron usando un anticuerpo monoclonal anti cadena CD3ζ humana (BD Biosciences). Se detectó la unión de anticuerpo explorando la mancha de transferencia con anticuerpo de cabra anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano 25 rusticano seguido de detección luminiscente usando Reactivo de Quimioluminiscencia Western Lighting Plus (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA) según las instrucciones del fabricante.

Ensayos de citotoxicidad

30 Se evaluó la citotoxicidad de linfocitos T modificados *in vitro* usando el ensayo DELFIA® EuTDA (PerkinElmer LAS, Inc, Boston, MA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se evaluó la citotoxicidad a las 2 horas en linfocitos T efectores para dirigirse a OV-CAR3(MUC-CD) o células tumorales primarias (E:T) a las relaciones indicadas. Los linfocitos T efectores en estos ensayos representan el número de linfocitos T CD8⁺ CAR^{*}.

Ensayos de detección de citocinas

35 Se realizaron ensayos de citocinas según las especificaciones del fabricante usando un ensayo de detección de citocinas humanas múltiple para detectar IL-2 e IFNγ (Millipore Corporation, Billerica, MA) usando el sistema Luminex IS 100. Se evaluaron las concentraciones de citocinas usando software IS 2.3 (Luminex Corp., Austin, TX).

*Modelos tumorales de ratón Beige SCID *in vivo**

40 En todos los estudios *in vivo*, se inyectaron en FOX CHASE C.B.-17 (ratones Beige SCID) de 8-12 semanas de edad (Taconic, Hudson, NY) inicialmente ip 3 x 10⁶ OV-CAR3(MUC-CD), o para estudios de captura de imágenes bioluminiscentes (BLI) 3 x 10⁶ células tumorales OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc). Posteriormente, se inyectaron 3 x 10⁷ linfocitos T CAR⁺ ip o iv el día 1 o 7 después de la inyección tumoral como se indica. Los ratones se 45 supervisaron con respecto a malestar por aumento de circunferencia abdominal, pelo erizado y respuesta reducida a los estímulos. Se sacrificó a los ratones con malestar. Todos los estudios murinos se realizaron en el contexto de un protocolo aprobado por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (n.º 00-05-065).

Captura de imágenes bioluminiscentes (BLI) de células tumorales OVCAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) en ratones Beige SCID

50 Se realizó BLI usando sistema de captura de imágenes Xenogen IVIS con software Living Image (Xenogen, Alameda, CA). Brevemente, se inyectó a ratones portadores de tumores OVCAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) ip D-luciferina (150 mg/kg, Xenogen) suspendida en 200 µl de PBS y se capturaron imágenes con anestesia de isoflurano 55 2 % después de 10 minutos. La adquisición de imágenes se realizó en un campo de visión de 25 cm a nivel de agrupamiento medio durante 0,5 minutos de tiempo de exposición (3, 43).

Citometría de flujo

60 Todos los análisis citométricos de flujo de linfocitos T y células tumorales se realizaron usando un citómetro FACScan con software Cellquest (BD Biosciences). Se analizaron linfocitos T usando anticuerpo polyclonal específico de CAR de cabra Alexa Fluor 647 (Molecular probes, Eugene, OR), anticuerpos marcados con ficoeritrina anti CD4, CD8, B7.1 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), B7.2 (Invitrogen, Camarillo, CA), 4-1BBL y OX40 humanos (Ancell Corporation, Bayport, MN). Se tiñeron células 3T3(MUC-CD) y OV-CAR3(MUC-CD) con anticuerpo 65 4H11 marcado con Alexa Fluor 647 (generado y marcado en la instalación central de anticuerpos monoclonales de MSKCC).

Marcaje con CFSE de linfocitos T CARP

Se tiñeron linfocitos T CAR⁺ con CFSE usando el kit de proliferación celular de CFSE CellTrace™ siguiendo las recomendaciones del fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR). Se analizó la proliferación de linfocitos T marcados con CFSE por FACS. Para detección de linfocitos T marcados con CFSE *in vivo*, se maceraron tumores ováricos a través de un tamiz celular de 40 µm (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) y se lavaron dos veces con FBS/PBS 2 % antes de tinción con anticuerpos y análisis de FACS.

Estadística

Los datos de supervivencia se evaluaron por análisis de rangos logarítmicos usando software GraphPad Prism (software GraphPad Prism, San Diego, CA). Los datos de citocinas se analizaron por ensayo de t de una cola de Student.

15 Resultados

Se han construido vectores retrovirales SFG que codifican CAR de primera (4H11z) y segunda generación (4H11-28z) dirigidos al antígeno MUC-CD usando el hibridoma 4H11 que genera un MAb específico para el antígeno MUC-CD (Figura 11A). Se confirmó la expresión de proteínas CAR de tamaño apropiado por análisis de transferencia de Western de células productoras retrovirales PG-13 (SFG-4H11z y SFG-4H11-28z) exploradas con un anticuerpo específico de cadena ζ (datos no mostrados).

Para evaluar la función del CAR 4H11z de primera generación, se transdijeron por retrovirus linfocitos T donadores sanos aislados de sangre periférica para expresar los CAR 4H11z y 19z1 de control (Figura 11B). La función del CAR 4H11z se evaluó por proliferación de linfocitos T transducidos con 4H11z después de cocultivo en AAPC 3T3 (MUC-CD/B7.1). Los resultados demuestran la proliferación específica de linfocitos T transducidos por 4H11z, en comparación con linfocitos T modificados por 19z1 (Figura 11C). Estos datos son coherentes con unión específica mediada por CAR 4H11z con el antígeno MUC-CD y posterior activación de linfocitos T.

Ya que la mayoría de los tumores malignos no expresan ligandos coestimulantes, se modificó adicionalmente el CAR 4H11z para expresar los dominios de señalización coestimulantes transmembrana y citoplasmáticos CD28, construyendo el CAR 4H11-28z de segunda generación (Figura 11A). Para evaluar si el CAR 4H11-28z, cuando se expresa por linfocitos T humanos, era capaz de generar una señal activadora primaria (denominada "señal 1") a través de la cadena ζ , así como una señal coestimulante (denominada "señal 2") a través del dominio citoplasmático de CD28, que a su vez permite proliferación de linfocitos T eficaz en ausencia de ligandos coestimulantes exógenos, se comparó la proliferación de linfocitos T después de cocultivo en AAPC 3T3(MUC-CD) o 3T3(MUC-CD/B7.1) en ausencia de citocinas exógenas. Como se esperaba, los linfocitos T 4H11-28z⁺ de segunda generación se expandieron notablemente en comparación con linfocitos T 4H11z⁺ tras cocultivo con AAPC 3T3(MUC-CD). Por el contrario, linfocitos T tanto 4H11z⁺ como 4H11-28z⁺ se expandieron de forma similar en AAPC 3T3(MUC-CD/B7.1) (Figura 12A). La coestimulación mediada por el CAR 4H11-28z se verificó adicionalmente por análisis de sobrenadantes de cultivo tisular del día 2 de experimentos de cocultivo en AAPC 3T3(MUC-CD) que demostraban secreción de IL-2 potenciada, una citocina normalmente secretada en el contexto de coestimulación de linfocitos T, en comparación con linfocitos T 19z1⁺ y 19-28z⁺ de control y linfocitos T 4H11z⁺ de primera generación (Figura 12B). La secreción de IFNy fue comparable entre linfocitos T activados 4H11z⁺ y 4H11-28z⁺.

A continuación se evaluó la capacidad de linfocitos T dirigidos a MUC-CD para expandirse después de reestimulaciones semanales mediante cocultivo en AAPC 3T3(MUC-CD/B7.1) en el contexto de IL-2 e IL-15 exógeno (3). Los linfocitos T tanto 4H11z⁺ como 4H11-28z⁺ se expandieron más de 2 log durante 3 semanas (Figura 12C). Los linfocitos T transducidos con el 4H11-28z se analizaron adicionalmente por FACS para expresión de CAR 7 días después de la activación inicial en AAPC y después de dos coestimulaciones posteriores en AAPC que demostraron un enriquecimiento esperado de la fracción de linfocitos T CAR⁺ (Figura 12D). Se generaron datos similares con linfocitos T 4H11z⁺ expandidos (datos no mostrados).

*55 Citotoxicidad y proliferación *in vitro* de linfocitos T dirigidos a MUC-CD después de cocultivo con OV-CAR3(MUC-CD) y células de tumor ovárico derivadas de líquido ascítico recién aislado.*

Para evaluar la capacidad de linfocitos T 4H11z⁺ y 4H11-28z⁺ para dirigirse a y lisar tumores de carcinoma ovárico humano, se utilizó la línea celular OV-CAR3 humana que se modificó genéticamente para expresar el antígeno MUC-CD reflejando de este modo mejor la mayoría de muestras tumorales ováricas clínicas que expresan el antígeno MUC-CD al que se dirige 4H11 (48). Se verificó inicialmente la lisis específica de linfocitos T dirigidos a MUC-CD demostrando actividad citotóxica significativa similar de linfocitos T modificados por CAR 4H11z y 4H11-28z que se dirigían a células tumorales OV-CAR3(MUC-CD) en comparación con linfocitos T de control que expresaban los CAR 19z1 y 1928z dirigidos a CD 19 de primera y segunda generación irrelevantes (Figura 13A). Los linfocitos T donadores sanos modificados para expresar el CAR 4H11-28z mostraron de forma similar lisis de células de carcinoma ovárico MUC-CD⁺ derivadas de líquido ascítico recién aislado en comparación con linfocitos T transducidos con 19-28z (Figura 13B). Además, los linfocitos T de sangre periférica del paciente modificados para

expresar el CAR 4H11-28z lisaron de forma similar células tumorales MUC-CD⁺ primarias autólogas de la misma muestra ascítica en comparación con linfocitos T modificados para expresar el CAR 19-28z de control (Figura 13C).

5 Se evaluó adicionalmente la capacidad de linfocitos T 4H11z⁺ y 4H11-28z⁺ de donantes sanos para proliferar después de cocultivo en OV-CAR3(MUC-CD) como se evaluó mediante FACS de linfocitos T marcados con CFSE, así como números de linfocitos T absolutos durante 7 días después de cocultivo con tumor (Figuras 13D y E). Sorprendentemente, se descubrió que linfocitos T tanto 4H11z⁺ como 4H11-28z se expandieron igualmente bien después de cocultivo con células tumorales OV-CAR3(MUC-CD) lo que sugiere la capacidad de esta línea celular tumoral para coestimular linfocitos T mediante expresión de un ligando coestimulante. Para abordar esta posibilidad, 10 se realizaron análisis de FACS adicionales de células tumorales OV-CAR3(MUC-CD) que demuestran expresión del ligando 4-1BBL coestimulante (Figura 13F), pero no los ligandos coestimulantes B7.1, B7.2 u OX-40L (datos no mostrados).

15 *Actividad antitumoral in vivo de linfocitos T dirigidos a MUC-CD en ratones Beige SCID.*

15 Para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de linfocitos T 4H11z⁺ y 4H11-28z⁺, se generó a continuación un modelo tumoral de cáncer ovárico de xenotrasplante ortotópico mediante inyección ip de células tumorales OV-CAR3(MUC-CD) en ratones Beige SCID. Si se dejaron sin tratar, estos ratones desarrollaron ascitis notable y tumores peritoneales nodulares múltiples a las 3 semanas después de inyección de células tumorales (Figura 14A). Todos 20 los ratones portadores de tumores no tratados tuvieron que sacrificarse a las 7 semanas después de inyección de células tumorales debido a evidencias de malestar.

25 Para evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de linfocitos T dirigidas a MUC-CD, se inyectó a ratones Beige SCID ip células tumorales OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) el día 1 después de inyección ip de linfocitos T 4H11z⁺ o 4H11-28z⁺ el día 2. Para controles negativos, los ratones portadores de tumores se trataron o se dejaron sin tratar con linfocitos T modificados para expresar el CAR dirigido a CD19 irrelevante. De forma colectiva, se descubrió que el 27 % de todos los ratones tratados con linfocitos T dirigidos a MUC-CD (3/11 ratones) permanecieron vivos sin pruebas clínicas de enfermedad 120 días después de la inyección tumoral sin diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia en comparación con las cohortes tratadas con linfocitos T 4H11z⁺ y 4H11-28z⁺ 30 (Figura 14B). Por el contrario, ambas cohortes tratadas con linfocitos T dirigidos a MUC-CD demostraron supervivencia potenciada de forma estadísticamente significativa en comparación con cohortes de control tratadas con linfocitos T 19z1⁺ y no tratadas.

35 Para evaluar si los linfocitos T dirigidos a MUC-CD infundidos de forma sistémica se transportaron con éxito a tumores ip, se comparó a continuación la infusión ip con iv de linfocitos T 4H11-28z⁺ en ratones Beige SCID que portaban tumores OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) ip. Los ratones tratados con linfocitos T 4H11-28z⁺ tanto ip como iv mostraron supervivencia estadísticamente potenciada en comparación con cohortes de control tratadas con linfocitos T 19-28z⁺ o no tratadas como se evaluó mediante supervivencia general (Figura 15A) así como mediante BLI de progresión tumoral (Figura 15B). Además, se descubrió que la supervivencia general entre los grupos 40 tratados con ip e iv era estadísticamente equivalente por análisis de rangos logarítmicos. Estos datos implican el transporte exitoso de linfocitos T 4H11-28z⁺ infundidos iv a tumores peritoneales. Se confirmó adicionalmente el transporte de linfocitos T 4H11-28z⁺ marcados con CFSE infundidos iv al peritoneo por análisis de FACS de suspensiones celulares individuales de tumores OV-CAR3(MUC-CD) macerados (Figura 15C).

45 *Actividad antitumoral in vivo de linfocitos T dirigidos a MUC-CD en ratones Beige SCID que portaban tumores OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc).*

50 Para evaluar adicionalmente si los linfocitos T 4H11-28z⁺ eran capaces de erradicar cargas tumorales más clínicamente relevantes, se trataron a continuación ratones Beige SCID que portaban tumor OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) ip bien establecido inyectado 7 días antes de la terapia de linfocitos T adoptiva. Una vez más, se descubrió que la terapia con linfocitos T dirigidos a MUC-CD erradicaba notablemente enfermedad evidente de BLI en todos los ratones tratados (Figura 16A) desarrollando 5 de 8 ratones tratados con el tiempo enfermedad progresiva recidivante y permaneciendo 3 ratones sin enfermedad como se evaluó por captura de imágenes de BLI (no mostrado) hasta 120 días después de la infusión de células tumorales (Figura 16B). Estos datos demuestran una 55 potente actividad antitumoral *in vivo* mediada por linfocitos T dirigidos a MUC-CD incluso en la situación de enfermedad avanzada.

Discusión

60 Basándose en análisis extensivo de muestras tumorales de pacientes, los carcinomas ováricos parecen ser tumores relativamente inmunogénicos. Específicamente, los investigadores han descubierto que hay una correlación directa entre el pronóstico después de cirugía y quimioterapia y la cantidad de linfocitos T efectores infiltradores de tumores (TIL) en muestras tumorales pretratamiento (25, 49, 50). Además, otros han descrito una correlación inversa entre el pronóstico después de la terapia y los niveles pretratamiento de Treg dentro del tumor, que a su vez supuestamente 65 inhiben la función antitumoral de TIL efectores específicos de tumor (26, 28, 51). Ambos de estos hallazgos implican un papel para una respuesta de linfocitos T efectores endógenos al tumor en el control de la progresión de

enfermedad tanto antes como después de la terapia inicial y apoyan fuertemente la afirmación de que los carcinomas ováricos pueden ser susceptibles de destrucción por infusión adoptiva de linfocitos T autólogos dirigidos a antígenos de células tumorales ováricas.

- 5 Aunque los TIL efectores endógenos son una fuente de linfocitos T supuestamente específicos de tumor, un enfoque alternativo para la terapia de linfocitos T adoptiva es aislar linfocitos T de sangre periférica autólogos que a su vez pueden modificarse genéticamente *ex vivo* para dirigirse a antígenos de células tumorales. Uno de dichos enfoques genéticos es transducir de forma retroviral linfocitos T de pacientes con CAR dirigidos a antígenos expuestos en superficie bien únicos de o sobreexpresados por el tumor. Para este fin, se han trasladado recientemente estudios 10 preclínicos prometedores que utilizan este enfoque en otros tumores malignos a la situación clínica (6, 16, 19, 52). De forma similar, se han generado previamente CAR dirigidos al antígeno CD 19 expresado en linfocitos B normales así como la mayoría de tumores malignos de linfocitos B y se están realizando en la actualidad ensayos clínicos que tratan a pacientes con leucemia linfocítica crónica de linfocitos B recidivante y leucemias linfoblásticas agudas con linfocitos T autólogos modificados para expresar un CAR específico de CD 19 (53).
- 15 La aplicación de este enfoque a carcinomas ováricos requiere la identificación de antígenos diana adecuados expresados en la superficie de células tumorales. De forma significativa, otros investigadores han estudiado este enfoque en situación tanto preclínica como clínica (4, 11, 54-57). Específicamente, varios grupos han demostrado respuestas antitumorales significativas a tumores de línea celular de carcinoma ovárico humano subcutáneo en 20 ratones inmunocomprometidos después de infusión intratumoral y/o intravenosa de linfocitos T que expresan CAR específicos de los antígenos de mesotelina y Lewis-Y sobreexpresados en estas líneas celulares tumorales (56, 58, 59). Recientemente, Kershaw *et al* han publicado recientemente los resultados de un ensayo clínico de fase I que trata a pacientes con carcinomas ováricos recidivantes con linfocitos T autólogos modificados para expresar un CAR específico del receptor de alfa-folato (6). Los autores de este estudio han descubierto que la terapia con linfocitos T dirigidos se toleró bien, pero observaron una falta de respuesta antitumoral en estos estudios relacionada con 25 escasa persistencia de linfocitos T modificados a lo largo del tiempo así como un factor inhibidor de linfocitos T aún no definido en el suero de varios pacientes tratados.
- 30 En los estudios de los inventores, se ha elegido dirigirse a la glucoproteína MUC-16 que está sobreexpresada en una mayoría de carcinomas ováricos (1, 30, 32, 33). La utilidad de MUC-16 como un antígeno diana para terapia de linfocitos T adoptiva está comprometida por el hecho de que la mayoría de la parte extracelular de esta molécula 35 está escindida por la célula tumoral, secretada, y puede detectarse en el suero como el marcador tumoral CA-125. Sin embargo, después de la escisión de esta fracción secretada de MUC-16, sigue existiendo una fracción extracelular residual de la glucoproteína, denominada MUC-CD, que está conservada en la superficie tumoral y es por lo tanto una diana atractiva para terapias basadas en inmunidad. Para este fin, se utilizó una serie de hibridomas murinos generados para el antígeno MUC-CD para construir CAR específicos para MUC-CD. De estos CAR, se identificó un CAR generado a partir del hibridoma murino 4H11 denominado 4H11z, que, cuando se expresó en linfocitos T humanos, después de cocultivo en AAPC 3T3(MUC-CD/B7.1), dio como resultado rápida destrucción de 40 monocapas de AAPC así como expansión de linfocitos T modificados notable. Significativamente, el antígeno para el anticuerpo 4H11 está altamente expresado en una mayoría de muestras tumorales quirúrgicas de carcinoma ovárico pretratamiento obtenidas de pacientes tratados en la institución de los inventores como se evaluó por inmunohistoquímica (48).
- 45 La activación de linfocitos T óptima requiere tanto una señal mediada por receptor de linfocitos T primario, "señal 1", junto con una "señal 2" coestimulante. Clásicamente, esta señal coestimulante puede proporcionarse por ligamiento de B7.1 (CD80) o B7.2 (CD86) en la célula diana con el receptor coestimulante de linfocitos T CD28. Como alternativa, puede generarse coestimulación por ligamiento de 4-1BBL u OX-40L en la célula diana con los 50 receptores coestimulantes de 4-1BB u OX40 respectivos en el linfocito T (12, 60, 61). Ya que la mayoría de células tumorales no consiguen expresar ligandos coestimulantes, los inventores y otros han demostrado previamente que los CAR de segunda generación que incorporan además los dominios de señalización citoplasmática, los receptores coestimulantes CD28, 4-1BB y/u OX40 dieron como resultado CAR capaces de proporcionar tanto señal 1 como señal 2 al linfocito T tras la unión con el antígeno afín en ausencia de ligandos coestimulantes exógenos (7-10, 12, 13, 15, 16, 62-65). Para este fin, se construyó un CAR de segunda generación a partir del CAR 4H11z que 55 incorporaba el dominio de señalización transmembrana y citoplasmático de CD28 como se ha descrito en otra parte (3, 9, 43). De forma coherente con estudios previos se ha descubierto que los linfocitos T transducidos para expresar el CAR 4H11-28z resultante, pero no el CAR 4H11z de primera generación, se expandieron eficazmente tras cocultivo con fibroblastos 3T3(MUC-CD) en ausencia de coestimulación exógena coherente con la capacidad del CAR 4H11-28z para suministrar tanto señal 1 como señal 2 al linfocito T. Esta conclusión está apoyada adicionalmente por el hallazgo de que los linfocitos T 4H11-28z⁺ secretaron niveles significativamente mayores de 60 IL-2, una citocina indicativa de coestimulación de linfocitos T, tras cocultivo en fibroblastos 3T3(MUC-CD) en comparación con linfocitos T transducidos para expresar el CAR 4H11z de primera generación.
- 65 Se evaluó a continuación la capacidad de linfocitos T 4H11z⁺ y 4H11-28z⁺ para dirigirse a y lisar células tumorales de carcinoma ovárico humano. Para este fin, se utilizó inicialmente la línea celular de cáncer ovárico humano OV-CAR3. Ya que la línea celular tumoral OV-CAR3 se une al anticuerpo 4H11 débilmente, se modificó genéticamente de forma adicional la línea celular para expresar MUC-CD (OV-CAR3(MUC-CD)) para imitar mejor la situación clínica

en la que una mayoría de muestras de ensayo tumorales de carcinoma ovárico clínico expresan en alta medida el antígeno MUC-CD de 4H11 (48). Se demostró que los linfocitos T humanos modificados para expresar 4H11z o 4H11-28z erradicaron células tumorales OV-CAR3(MUC-CD) *in vitro*, y sorprendentemente observaron que los linfocitos T tanto 4H11z⁺ como 4H11-28z⁺ se expandieron después de cocultivo con tumor *in vitro*. Para definir la

5 etiología de esta expansión de linfocitos T 4H11z⁺ no anticipada, se evaluó adicionalmente si las células tumorales OV-CAR3(MUC-CD) expresaban ligandos coestimulantes, y descubrieron que esta línea celular tumoral expresaba 4-1BBL, de forma coherente con los hallazgos experimentales de los inventores así como con informes previamente publicados que demostraban la expresión de 4-1BBL por diversas líneas celulares de carcinoma (66-68). Para 10 validar adicionalmente la relevancia clínica de estos hallazgos, se demostró posteriormente lisis *in vitro* específica de células tumorales derivadas de líquido ascítico primario aisladas de pacientes con carcinoma ovárico no tratado por linfocitos T 4H11-28z⁺ halogénicos donadores sanos así como linfocitos T de sangre periférica de pacientes 4H11-28z⁺ más significativamente autólogos. Estos datos apoyan fuertemente el argumento de que el tratamiento con linfocitos T CAR⁺ basados en 4H11 autólogos son prometedores en aplicaciones clínicas futuras.

15 Para evaluar la relevancia *in vivo* de los hallazgos de los inventores *in vitro*, se generó a continuación un modelo tumoral de OV-CAR3(MUC-CD) ortotópico murino en ratones Beige SCID. Se inyectaron a ratones i.p. células tumorales OV-CAR3(MUC-CD) y el día siguiente se infundieron linfocitos T 4H11z⁺, 4H11-28z⁺ y 19z1⁺ de control i.p. Este enfoque de tratamiento dio como resultado un retardo significativo pero similar a la progresión tumoral y supervivencia a largo plazo en cohortes tratadas con linfocitos T tanto 4H11z⁺ como 4H11-28z⁺ en comparación con 20 ratones no tratados o ratones tratados con linfocitos T de control dirigidos al antígeno CD19 irrelevante. A continuación se comparó el tratamiento ip con el iv con linfocitos T 4H11-28z⁺ de ratones portadores de OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) ortotópico, y se descubrieron supervivencias estadísticamente significativas similares de ratones a lo largo del tiempo con infusión ip directa de linfocitos T o infusión iv sistémica de linfocitos T dirigidos. 25 Significativamente, los ratones tratados iv el día 1 después del tratamiento, mostraron transporte exitoso de linfocitos T dirigidos al peritoneo. Estos datos sugieren que la terapia adoptiva con linfocitos T dirigidos puede ser igualmente eficaz después de una infusión directa en el peritoneo o mediante infusión iv sistémica. Estos hallazgos apoyan adicionalmente el potencial clínico futuro de este enfoque en el tratamiento de pacientes tanto con recaída local de enfermedad como con recaída metastásica en sitios fuera del peritoneo.

30 Finalmente, se evaluó la capacidad de linfocitos T 4H11-28z⁺ para erradicar enfermedad más establecida retardando la infusión ip de linfocitos T modificados en 7 días, cuando los ratones tuvieron cargas tumorales establecidas mayores como se evaluó por captura de imágenes bioluminiscentes. Esta situación experimental refleja mejor la 35 situación clínica inicial en la que este enfoque de linfocitos T adoptivo se utilizaría. Significativamente, a pesar de la situación de enfermedad notablemente establecida, los linfocitos T 4H11-28z⁺ conservaron la capacidad de lisar cargas tumorales mayores, retardar la recaída del tumor y, en un porcentaje significativo de ratones, erradicar completamente la enfermedad.

En los estudios presentados en el presente documento, se utilizaron uniformemente poblaciones mixtas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CAR⁺ para evaluar la actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Para este fin, los estudios 40 continuados abordarán el papel de subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CAR⁺ aislados en la erradicación exitosa de enfermedad en este modelo de tumor OV-CAR3(MUC-CD) de Beige SCID. Los resultados de estos estudios pueden tener implicaciones para trasladar este enfoque terapéutico a la situación clínica. Además, se reconocen las limitaciones asociadas con el modelo tumoral de Beige SCID presentado. Concretamente, este es un 45 modelo de xenotrasplante en un ratón inmunocomprometido. Para este fin, los estudios continuados en el laboratorio de los inventores se centran en la generación de un modelo tumoral inmunocompetente singénico clínicamente relevante para definir mejor la biología y eficacia antitumoral de linfocitos T modificados por CAR dirigidos a MUC-CD en el contexto de un sistema inmunitario intacto.

50 En conclusión, se presentan en el presente documento los primeros datos publicados que demuestran la viabilidad de dirigirse a MUC-16, un antígeno sobreexpresado en una mayoría de carcinomas ováricos, mediante terapia adoptiva con linfocitos T modificados genéticamente dirigidos a la parte de MUC-CD conservada del antígeno MUC-16. Además, este informe es el primero en demostrar dirección eficaz de linfocitos T en un modelo murino, ortotópico, clínicamente relevante, de cáncer ovárico, demostrando eficacia por infusión tanto ip como iv de linfocitos T modificados. Finalmente, estos datos apoyan el traslado adicional de este enfoque a la situación clínica en forma 55 de un ensayo clínico de fase I en pacientes con carcinomas ováricos persistentes o recidivantes después de terapia inicial con cirugía y quimioterapia. [jfl]

Ejemplo 5

60 **Inducción de anticuerpos monoclonales de MUC16 de ratón en ratones y hámsteres.**

65 Se seleccionaron 3 regiones diferentes de genoma de MUC16 de ratón para las que se generaron anticuerpos monoclonales en ratón y hámster. Las regiones seleccionadas del MUC16 de ratón son Péptido 1 (SEQ ID NO: 21, ectorregión del dominio citoplasmático), Péptido 2 (SEQ ID NO: 22, primer bucle de cisteína) y Péptido 3 (SEQ ID NO: 23, segundo bucle de cisteína) (Figura 20A) y su comparación con MIUC16 humano se muestra en la Figura 20B. Se añadió una cisteína a la secuencia peptídica en el extremo N terminal del Péptido 1 (SEQ ID NO: 21) y el

Péptido 3 (SEQ ID NO: 23) para mejor conjugación con KLH. Se conjugaron péptidos individuales con KLH usando kit Promega. Estos 3 péptidos conjugados se agruparon e inmunizaron en 5 ratones y 4 hámsteres. Se administraron 5 inmunizaciones con un intervalo de 3 semanas para cada inmunización. Se ensayaron sueros de estos animales por ELISA con respecto a su reactividad específica con péptidos individuales (SEQ ID NO: 21, 22 y 23). Se permitió que animales seleccionados positivos descansaran durante un mes y después se reforzaron i.v. con inmunógeno de péptidos agrupados (SEQ ID NO: 21, 22 y 23) y se recogieron los bazoos después de 4 días. Se mezclaron esplenocitos con compañeros de hibridoma y se sembraron en placas de microtitulación a diversas densidades clonales. Las placas se cultivaron a 37 °C CO₂ 5 % durante 10 días y después se seleccionaron los clones. Los sobrenadantes de estos clones seleccionados se ensayaron por ELISA con respecto a su reactividad específica con péptidos individuales (SEQ ID NO: 21, 22 y 23). Se ensayaron sobrenadantes clonales positivos mediante FACS, transferencia de Western y captura de imágenes usando 2 líneas celulares de ratón (ID8 y BR5-FVB1) y una línea celular humana (OVCAR-3).

La Tabla 4 muestra el sumario de anticuerpos monoclonales de ratón y hámster contra antígenos peptídicos MUC16 de ratón Péptido 1 (SEQ ID NO: 21), Péptido 2 (SEQ ID NO: 22) y Péptido 3 (SEQ ID NO: 23). Se vio una respuesta antigenica muy fuerte con el Péptido 1 (SEQ ID NO: 21).

Tabla 4

MUC16 de ratón	mAb de ratón	mAb de Ratón Congelado
Péptido 1	46	16 (3-IgG1; 8-IgG2b; 1-IgM; 4-isotipo desconocido)
Péptido 2	0	0
Péptido 3	6	6 (4-IgG1; 2-IgM)
Péptido 1,2,3	0	0
Péptido 1,2	0	0
Péptido 2,3	0	0
Sin Péptido	0	0

Animales no reforzados iv con el péptido 2

MUC16 de hámster	mAb de hámster	mAb de Hámster Congelado
Péptido 1	69	21
Péptido 2	6	6
Péptido 3	7	7
Péptido 1,2,3	2	1
Péptido 1,2	1	1
Péptido 2,3	1	0
Sin Péptido	10	2

Se enumeran detalles de mAb de ratón y de hámster contra Péptido 1 (SEQ ID NO: 21), Péptido 2 (SEQ ID NO: 22) y Péptido 3 (SEQ ID NO: 23) en la Tabla 5 y la Tabla 6 respectivamente.

Tabla 5

isotipo	PÉPTIDO	Pocillo de fusión	Clonado	Clones			
-	1	01D01					
-	1	09F07					
IgG 1	1	16A09					
-	1	21A07					
-	1	24G10					
IgG 1	1	10C04					
IgG 1	1	17F02					
IgG 2b	1	01A08					
IgG 2b	1	01F08					
IgG 2b	1	12B10					
IgG 2b	1	17H10					
IgG 2b	1	18D05					
IgG 2b	1	23B12					
IgG 2b	1	25E09					
IgM	1	16F12					
IgG 1	3	04A06					
IgG 1	3	05D01					
IgG 1	3	21B08					
IgG 1	3	21E01					
IgM	3	08A02					
IgM	3	13E05					
				10C4-3H5	10C4-1F2	10C4-2H8	10C4-1G7
				17F2-3G5	17F2-3F6	17F2-2F9	17F2-1E11
				12B10-3F7	12B10-3G10	12B10-2F6	12B10-2F10
				25E9-3	25E9-5	25E9-13	25E9-16
				21B8-1H11	21B8-3G6	21B8-3H9	21B8-1G8
				21E1-1E3	21E1-1G9	21E1-2G7	21E1-3G12

5

Tabla 6

mAb de Hámster	Péptido	Clonado			
01H03					
02F02	1				
04E 4					
04G07	1				
04H01	3	4H1-2E1	4H1-2E3	4H1-3E1	4H1-3H3
06A08	1				
06F02	1				
07F08	3				
07H05	2				
09A05					
09E 1	3				
09F08	1				
09H10					
10G06	1				
10H11	1				
11B10	1				
12F09	2				
15A08	1	15A8-2E2	15A8-2E10	15A8-2E11	15A8-3D2
15H08	3				
19B05	1				
21H04	3				
22B05	2	22B5-1F6	22B5-3G9	22B5-2G8	22B5-3F11
22D11	3				
23G12	1				
25E 8	1				
27H09	3				
28B12	1 y 2 y 3				
28C12	2				
30H02	1				
31A11	2				

31C01	2				
33H06	1 y 2				
34F10	1				
34H05	1				
36C01	1				
36C11					
36E 4	1				
37E 10	1				
10H11	1				

El anticuerpo de hámster 22B05 reconoce secuencia de ratón (SEQ ID NO: 22) y también la humana correspondiente (SEQ ID NO: 15).

5 También se realizaron análisis de transferencia de Western usando extractos celulares de IDS y BR5-FVB1 de ratón para todos los anticuerpos monoclonales seleccionados como se muestra en la Figura 21 y Figura 22, respectivamente.

10 Entre los anticuerpos monoclonales de MUC16 de ratón, se seleccionó el mAb de ratón subclón 12B10-3G10 para exploración adicional. De forma similar, se seleccionaron anticuerpos monoclonales de hámster, subclones 15A8-2E10, 22B5-2G8 y 4H1-2E1 para exploración adicional.

15 Se realizó análisis inmunohistoquímico con parafina y crio secciones de líneas celulares ID8 (ratón), OVCAR-3 (humana), BR5-FVB1 (de ratón) y 13,5 días de embrión. Se exploraron secciones en parafina o crio secciones con mAb 12B10 de ratón, mAb 15A8 de hámster, 22B5 de hámster y 4E1 de hámster para ver el desarrollo temprano de MUC16 de ratón (Figura 23).

20 Se analizó adicionalmente el subclón 12B10-3G10 con respecto a fragmentos Fv monocatenarios. La Figura 24 muestra secuencias de ADN y aminoácidos de V_H y V_L de 12H10-3G10. Se generaron sobrenadantes biorreactivos y 12B10-3G10 purificado para estudios animales y otros estudios de caracterización. Se realizaron análisis de FACS con 12B10-3G10 purificado en ID8, células OVCAR3 y BR5-FVB1 que mostraban más de 90 % de positividad para fragmento de ectodominio de MUC16 tanto de ratón como humano (Figura 25).

Referencias citadas en la memoria descriptiva y ejemplos 1-3

- 25
1. Bast RC, Jr., Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981; 68(5): 1331-7.
 2. Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983; 309(15): 883-7.
 - 30 3. Rustin GJ, Bast RC, Jr., Kelloff GJ, Barrett JC, Carter SK, Nisen PD, et al. Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(11): 3919-26.
 4. Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, Yu Y, Lu KH, Diamandis EP, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 99(2): 267-77.
 - 35 5. Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, et al. New tumor markers:CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15 Supl 3: 274-81.
 6. Moore RG, MacLaughlan S, Bast RC, Jr. Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009.
 7. Nustad K, Lebedin Y, Lloyd KO, Shigemasa K, de Bruijn HW, Jansson B, et al. Epitopes on CA 125 from cervical mucus and ascites fluid and characterization of six new antibodies. Third report from the ISOBM TD-1 workshop. *Tumour Biol* 2002; 23(5): 303-14.
 - 40 8. Fendrick JL, Konishi I, Geary SM, Parmley TH, Quirk JG, Jr., O'Brien TJ. CA125 phosphorylation is associated with its secretion from the WISH human amnion cell line. *Tumour Biol* 1997; 18(5): 278-89.
 9. Fendrick JL, Staley KA, Gee MK, McDougald SR, Quirk JG, Jr., O'Brien TJ. Characterization of CA 125 synthesized by the human epithelial amnion WISH cell line. *Tumour Biol* 1993; 14(5): 310-8.
 - 45 10. O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Shigemasa K. The CA 125 gene:a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumour Biol* 2002; 23(3): 154-69.
 11. Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer* 2002; 98(5): 737-40.
 - 50 12. Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* 2001; 276(29): 27371-5.
 13. Hollingsworth M, Swanson B. Mucins in Cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews: Cancer* 2004; 4(1): 45-60.
 - 55 14. Huang L, Ren J, Chen D, Li Y, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(6): 702-6.
 15. Li Q, Ren J, Kufe D. Interaction of human MUC1 and beta-catenin is regulated by Lck and ZAP-70 in activated

- Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315(2): 471-6.
16. Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu WH, Huang L, et al. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell* 2004; 5(2): 163-75.
- 5 17. Ren J, Bharti A, Raina D, Chen W, Ahmad R, Kufe D. MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heregulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90. *Oncogene* 2006; 25(1): 20-31.
18. Ramsauer VP, Pino V, Farooq A, Carothers Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4-ErbB2 Complex Formation and Signaling in Polarized CACO-2 Epithelial Cells Indicate That Muc4 Acts as an Unorthodox Ligand for ErbB2. *Mol Biol Cell* 2006.
- 10 19. Bafna S, Singh AP, Moniaux N, Eudy JD, Meza JL, Batra SK. MUC4, a multifunctional transmembrane glycoprotein, induces oncogenic transformation of NIH3T3 mouse fibroblast cells. *Cancer Res* 2008; 68(22): 9231-8.
- 20 20. Ponnusamy MP, Singh AP, Jain M, Chakraborty S, Moniaux N, Batra SK. MUC4 activates HER2 signaling and enhances the motility of human ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 2008; 99(3): 520-6.
- 15 21. Nap M, Vitali A, Nustad K, Bast RC, Jr., O'Brien TJ, Nilsson O, et al. Immunohistochemical characterization of 22 monoclonal antibodies against the CA125 antigen: 2nd report from the ISOBOm TD-1 Workshop. *Tumour Biol* 1996; 17(6): 325-31.
22. Markwell MA, Fox CF. Surface - specific iodination of membrane proteins of viruses and eucarytic cells using 1,3,4, 6-tetrachloro-3alpha,6alpha-diphenylglycouril. *Biochemistry* 1978; 17: 4807-4817.
- 20 23. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4(7): 8447.
24. Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RS, Chen B, Qin J, Filippa DA, et al. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Hum Pathol* 2002; 33(10): 968-74.
- 25 25. Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27(2): 161-74.
26. O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD, York L. The CA 125 gene: an extracellular super-structure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol* 2001; 22(6): 348-66.
27. Harris M, Howell A, Chrissohou M, Swindell RI, Hudson M, Sellwood RA. A comparison of the metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1984; 50(1): 23-30.
- 30 28. Kaneko O, Gong L, Zhang J, Hansen JK, Hassan R, Lee B, et al. A binding domain on mesothelin for CA125/MUC16. *J Biol Chem* 2009; 284(6): 3739-49.

Referencias citadas en el ejemplo 4

- 35 1. Singh AP, Senapati S, Ponnusamy MP, et al. Clinical potential of mucins in diagnosis, prognosis, and therapy of ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9(11): 1076-85.
2. Sun CC, Ramirez PT, Bodurka DC. Quality of life for patients with epithelial ovarian cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4(1): 18-29.
3. Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med* 2003; 9(3): 279-86.
- 40 4. Hwu P, Yang JC, Cowherd R, et al. In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res* 1995; 55(15): 3369-73.
5. Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004; 18(4): 676-84.
- 45 6. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(20 Pt 1): 6106-15.
7. Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, et al. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother* 2009; 32(7): 689-702.
- 50 8. Loskog A, Giandomenico V, Rossig C, Pule M, Dotti G, Brenner MK. Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells. *Leukemia* 2006; 20(10): 1819-28.
9. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 2002; 20(1): 70-5.
- 55 10. Moeller M, Haynes NM, Trapani JA, et al. A functional role for CD28 costimulation in tumor recognition by single-chain receptor-modified T cells. *Cancer Gene Ther* 2004; 11(5): 371-9.
11. Parker LL, Do MT, Westwood JA, et al. Expansion and characterization of T cells transduced with a chimeric receptor against ovarian cancer. *Hum Gene Ther* 2000; 11(17): 2377-87.
- 60 12. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 2009; 21(2): 215-23.
13. Stephan MT, Ponomarev V, Brentjens RJ, et al. T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nat Med* 2007; 13(12): 1440-9.
- 65 14. Daly T, Royal RE, Kershaw MH, et al. Recognition of human colon cancer by T cells transduced with a chimeric receptor gene. *Cancer Gene Ther* 2000; 7(2): 284-91.
15. Jensen MC, Cooper LJ, Wu AM, Forman SJ, Raubitschek A. Engineered CD20-specific primary human cytotoxic T lymphocytes for targeting B-cell malignancy. *Cytotherapy* 2003; 5(2): 131-8.
16. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 2008; 14(11): 1264-70.

17. Savoldo B, Rooney CM, Di Stasi A, *et al.* Epstein Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD3Ozeta artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. *Blood* 2007; 110(7): 2620-30.
- 5 18. Wang G, Chopra RK, Royal RE, Yang JC, Rosenberg SA, Hwu P. A T cell-independent antitumor response in mice with bone marrow cells retrovirally transduced with an antibody/Fc-gamma chain chimeric receptor gene recognizing a human ovarian cancer antigen. *Nat Med* 1998; 4(2): 168-72.
- 10 19. Hollyman D, Stefanski J, Przybylowski M, *et al.* Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD 19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother* 2009; 32(2): 169-80.
- 15 20. Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, *et al.* Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* 2006; 24(13): e20-2.
- 20 21. Till BG, Jensen MC, Wang J, *et al.* Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 2008; 112(6): 2261-71.
- 25 22. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(9): 3360-5.
- 30 23. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, *et al.* Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58(3): 449-59.
- 35 24. Sato E, Olson SH, Ahn J, *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(51): 18538-43.
- 40 25. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(3): 203-13.
- 45 26. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10(9): 942-9.
- 50 27. Leffers N, Lambeck AJ, de Graeff P, *et al.* Survival of ovarian cancer patients overexpressing the tumour antigen p53 is diminished in case of MHC class I down-regulation. *Gynecol Oncol* 2008; 110(3): 365-73.
- 55 28. Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* 2008; 222: 101-16.
- 60 29. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, *et al.* The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(23): 8326-31.
- 65 30. Badgwell D, Bast RC, Jr. Early detection of ovarian cancer. *Dis Markers* 2007; 23(5-6): 397-410.
31. Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z, *et al.* New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15 Supl 3: 274-81.
32. Fritsche HA, Bast RC. CA 125 in ovarian cancer: advances and controversy. *Clin Chem* 1998; 44(7): 1379-80.
33. Krivak TC, Tian C, Rose GS, Armstrong DK, Maxwell GL. A Gynecologic Oncology Group Study of serum CA-125 levels in patients with stage III optimally debulked ovarian cancer treated with intraperitoneal compared to intravenous chemotherapy: an analysis of patients enrolled in GOG 172. *Gynecol Oncol* 2009; 115(1): 81-5.
34. O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD, York L. The CA 125 gene: an extracellular super-structure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol* 2001; 22(6): 348-66.
35. Bellone S, Anfossi S, O'Brien TJ, *et al.* Generation of CA125-specific cytotoxic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2.1-positive healthy donors and patients with advanced ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(1): 75 el-10.
36. Berek JS. Immunotherapy of ovarian cancer with antibodies: a focus on oregovomab. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4(7): 1159-65.
37. O'Brien TJ, Tanimoto H, Konishi I, Gee M. More than 15 years of CA 125: what is known about the antigen, its structure and its function. *Int J Biol Markers* 1998; 13(4): 188-95.
38. Rao TD, Park KJ, Smith-Jones P, *et al.* Novel monoclonal antibodies against proximal (carboxy-terminal) portions of MUC16 (submitted to Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphometry).
39. Wang Z, Raifu M, Howard M, *et al.* Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods* 2000; 233(1-2): 167-77.
40. Doenecke A, Winnacker EL, Hallek M. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) improves the PCR-based isolation of immunoglobulin variable region genes from murine and human lymphoma cells and cell lines. *Leukemia* 1997; 11(10): 1787-92.
41. Gong MC, Latouche JB, Krause A, Heston WD, Bander NH, Sadelain M. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. *Neoplasia* 1999; 1(2): 123-7.
42. Orlandi R, Gussow DH, Jones PT, Winter G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(10): 3833-7.
43. Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, *et al.* Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res* 2007; 13(18 Pt 1): 5426-35.
44. Riviere I, Brose K, Mulligan RC. Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(15): 6733-7.
45. Quintas-Cardama A, Yeh RK, Hollyman D, *et al.* Multifactorial optimization of gammaretroviral gene transfer into human T lymphocytes for clinical application. *Hum Gene Ther* 2007; 18(12): 1253-60.

46. Latouche JB, Sadelain M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18(4): 405-9.
47. Santos EB, Yeh R, Lee J, et al. Sensitive *in vivo* imaging of T cells using a membrane-bound *Gaussia princeps* luciferase. *Nat Med* 2009; 15(3): 338-44.
- 5 48. Park KJ, Soslow R, Linkov I, Rao TD, D S. The extracellular portion of the MUC16 cytoplasmic domain is detectable in ovarian carcinomas using novel monoclonal antibody, 4H11. *Mod Pathol*, 2008; 21(1s): 217A-218A.
49. Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Degl'innocenti D, et al. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol* 2005; 16(4): 590-6.
- 10 50. Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008; 108(2): 415-20.
51. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61(12): 4766-72.
- 15 52. Lamers CH, Langeveld SC, Groot-van Ruijven CM, Debets R, Sleijfer S, Gratama JW. Gene-modified T cells for adoptive immunotherapy of renal cell cancer maintain transgene-specific immune functions *in vivo*. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(12): 1875-83.
53. Brentjens R, Hollyman D, Weiss M, et al. A Phase I trial for the treatment of chemo-refractory chronic lymphocytic leukemia with CD19-targeted autologous T cells. *Molecular Therapy* 2008; 16: S15.
- 20 54. Barber A, Zhang T, DeMars LR, Conejo-Garcia J, Roby KF, Sentman CL. Chimeric NKG2D receptor-bearing T cells as immunotherapy for ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67(10): 5003-8.
55. Barber A, Zhang T, Sentman CL. Immunotherapy with chimeric NKG2D receptors leads to long-term tumor-free survival and development of host antitumor immunity in murine ovarian cancer. *J Immunol* 2008; 180(1): 72-8.
- 25 56. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD 137 domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(9): 3360-5.
57. Kershaw MH, Westwood JA, Hwu P. Dual-specific T cells combine proliferation and antitumor activity. *Nat Biotechnol* 2002; 20(12): 1221-7.
58. Hung CF, Wu TC, Monie A, Roden R. Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer. *Immunol Rev* 2008; 222: 43-69.
- 30 59. Westwood JA, Smyth MJ, Teng MW, et al. Adoptive transfer of T cells modified with a humanized chimeric receptor gene inhibits growth of Lewis-Y-expressing tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(52): 19051-6.
60. Habib-Agahi M, Jaberipour M, Searle PF. 4-1BBL costimulation retrieves CD28 expression in activated T cells. *Cell Immunol* 2009; 256(1-2): 39-46.
- 35 61. Habib-Agahi M, Phan TT, Searle PF. Co-stimulation with 4-1BB ligand allows extended T-cell proliferation, synergizes with CD80/CD86 and can reactivate anergic T cells. *Int Immunol* 2007; 19(12): 1383-94.
62. Brentjens RJ, Sadelain M. Somatic cell engineering and the immunotherapy of leukemias and lymphomas. *Adv Pharmacol* 2004; 51: 347-70.
- 40 63. Finney HM, Akbar AN, Lawson AD. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol* 2004; 172(1): 104-13.
64. Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(1): 35-45.
- 45 65. Wilkie S, Picco G, Foster J, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol* 2008; 180(7): 4901-9.
66. Li Q, Ai J, Song Z, Liu J, Shan B. 4-1BB (CD137) ligand enhanced anti-tumor immune response against mouse forestomach carcinoma *in vivo*. *Cell Mol Immunol* 2008; 5(5): 379-84.
- 50 67. Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, et al. Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol* 2000; 165(5): 2903-10.
68. Wan YL, Zheng SS, Zhao ZC, Li MW, Jia CK, Zhang H. Expression of co-stimulator 4-1BB molecule in hepatocellular carcinoma and adjacent non-tumor liver tissue, and its possible role in tumor immunity. *World J Gastroenterol* 2004; 10(2): 195-9.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un polipéptido de MUC16 o a una parte antigénica del mismo, en donde el polipéptido de MUC16 es
 5 TLDRSSVLVDGYSPNRNE (SEQ ID NO: 02)
 en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada variable ("VH") codificada por SEQ ID NO: 06 y una cadena ligera variable ("VL"), codificada por SEQ ID NO: 07.
- 10 2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 15 3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- 20 4. Un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo preparados sustituyendo las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo de la reivindicación 1 en un dominio de marco conservado humano, en donde el anticuerpo humanizado o el fragmento de unión a antígeno del mismo se unen específicamente al polipéptido de MUC16 de SEQ ID NO: 02 o a una parte antigénica del mismo.
- 25 5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 4, en donde restos de dominio de marco conservado se reemplazan por restos no humanos correspondientes.
- 30 6. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento F(ab')2 y un fragmento Fv.
- 35 7. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, se une covalentemente a un agente citotóxico o a un profármaco de un agente citotóxico.
- 40 8. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo se internaliza en una célula.
- 45 9. El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo carece de unión específica a un dominio extracelular de MUC16 glucosilado.
- 50 10. Una composición que comprende (a) el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 11. Una célula de hibridoma que produce un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1.
- 60 12. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de cadena pesada variable (VH) y la secuencia de cadena ligera variable (VL) de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.
- 65 13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para uso en un método para identificar que un sujeto tiene un cáncer en el que se expresa MUC16, en donde dicho método comprende administrar el anticuerpo al sujeto y determinar la presencia y la localización del anticuerpo en el sujeto, en donde el anticuerpo está radiomarcado.
- 70 14. El anticuerpo para uso de la reivindicación 13, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer ovárico y cáncer de mama.
- 75 15. Un método ex vivo para identificar que un sujeto tiene un cáncer en el que se expresa MUC16, en donde dicho método comprende
- 80 (a) poner en contacto una primera muestra de un sujeto con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en condiciones para la unión específica del anticuerpo a su antígeno afín; y
 85 (b) determinar si el anticuerpo tiene un nivel aumentado de unión a la primera muestra en comparación con una muestra de control que carece del cáncer en el que se expresa MUC16.
- 90 16. El método ex vivo de la reivindicación 15, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer ovárico y cáncer de mama.
- 95 17. El método ex vivo de las reivindicaciones 15 o 16, en el que la determinación se realiza usando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en inmunohistoquímica, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA),

clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), transferencia de Western, inmunoprecipitación y captura de imágenes radiográfica.

- 5 18. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para uso en el tratamiento de un cáncer en el que se expresa MUC16.
19. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de la reivindicación 18, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer ovárico y cáncer de mama.

Péptido 1 cerca del sitio de escisión:
NFSPLARRVDRVAIYEE (SEQ ID NO:01)

Péptido 2 antes de transmembrana:
TLDRSSVLVDGYSPNRNE (SEQ ID NO:02)

Péptido 3 dentro de transmembrana:
CGVLVTTRRKKEGEYNVQQQ (SEQ ID NO:03)

FIGURA 1

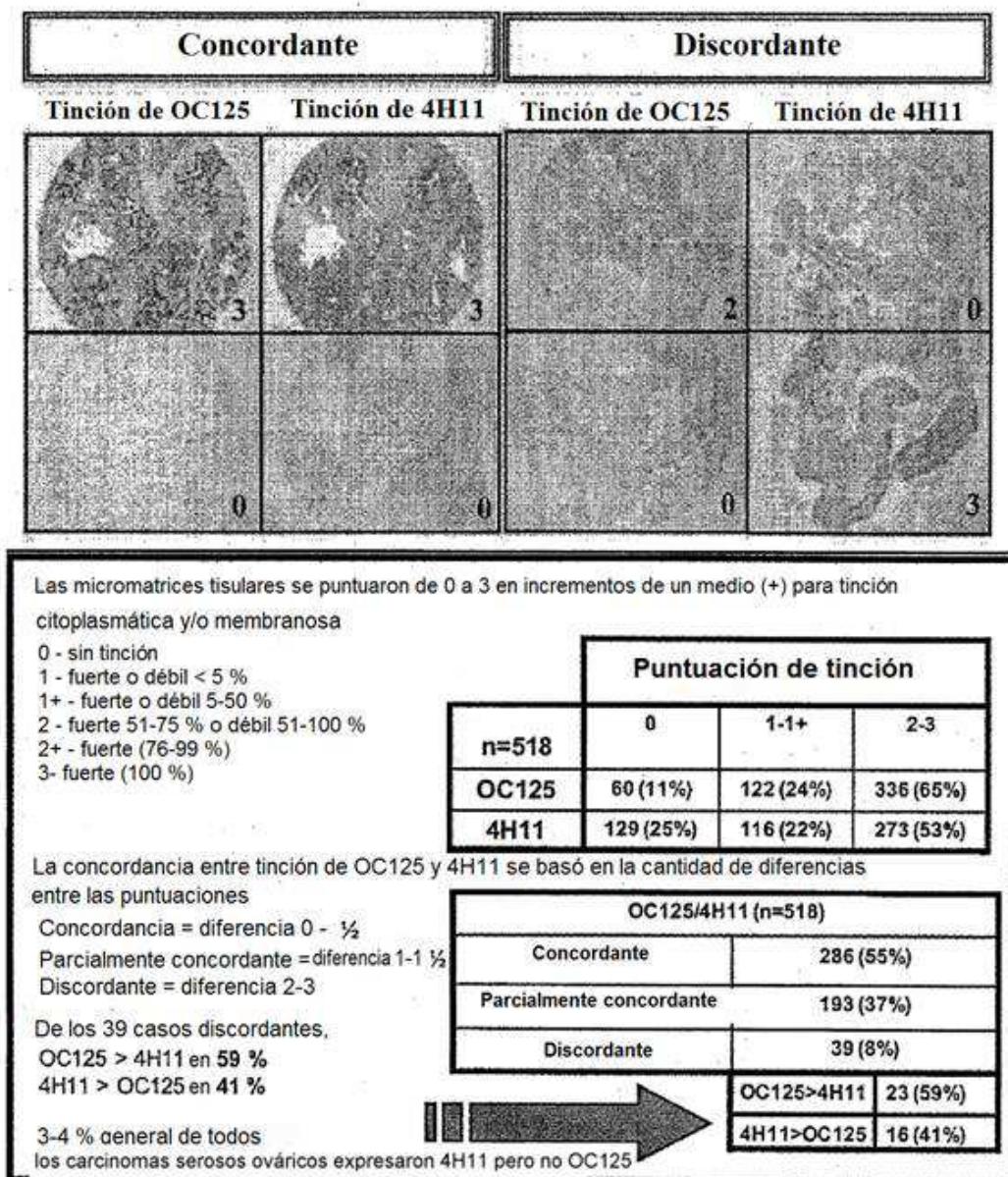


FIGURA 2



FIGURA 3A

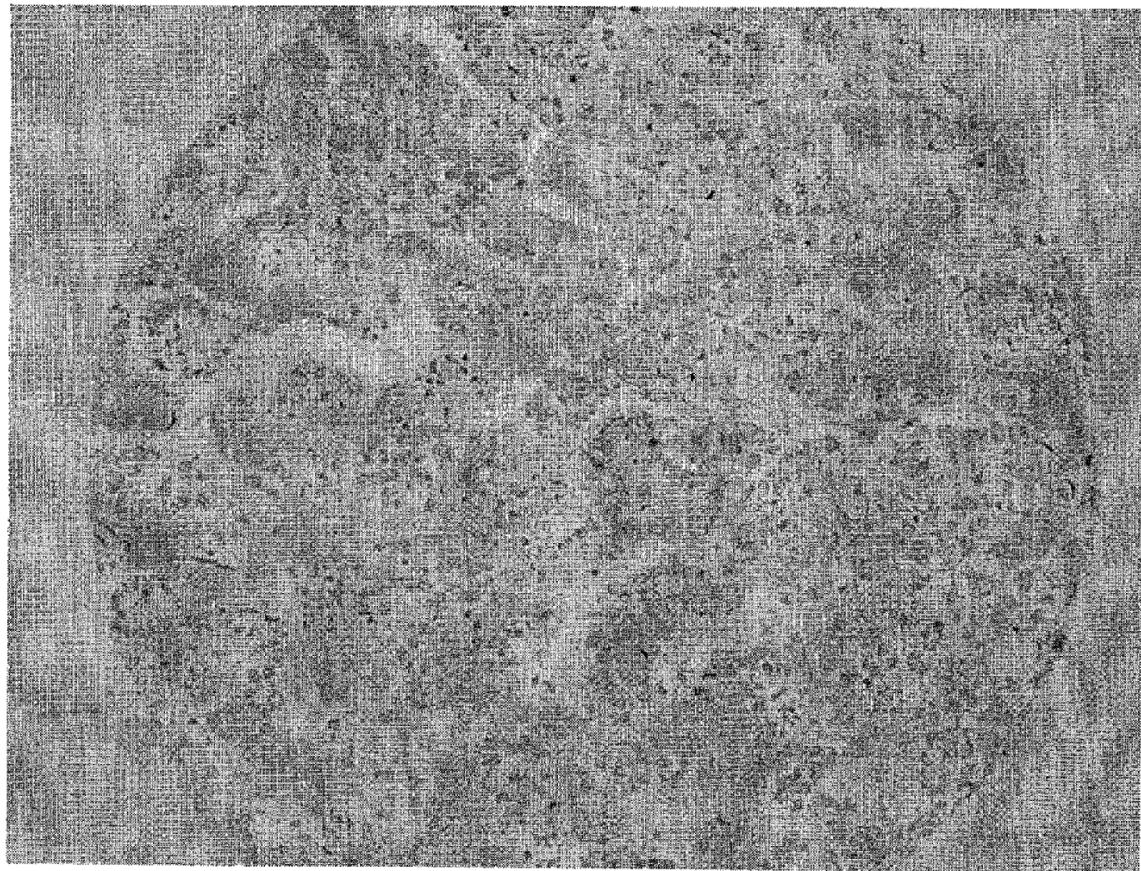


FIGURA 3B

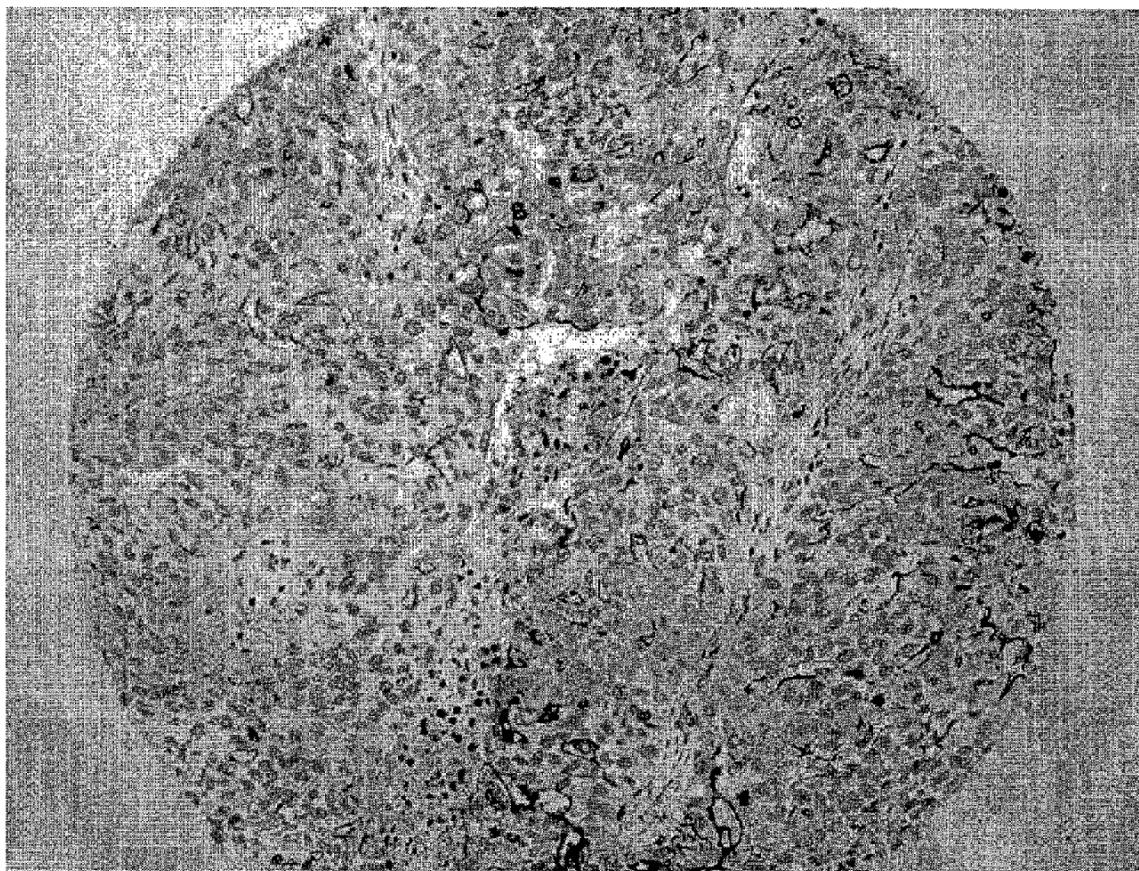


FIGURA 3C



FIGURA 3D

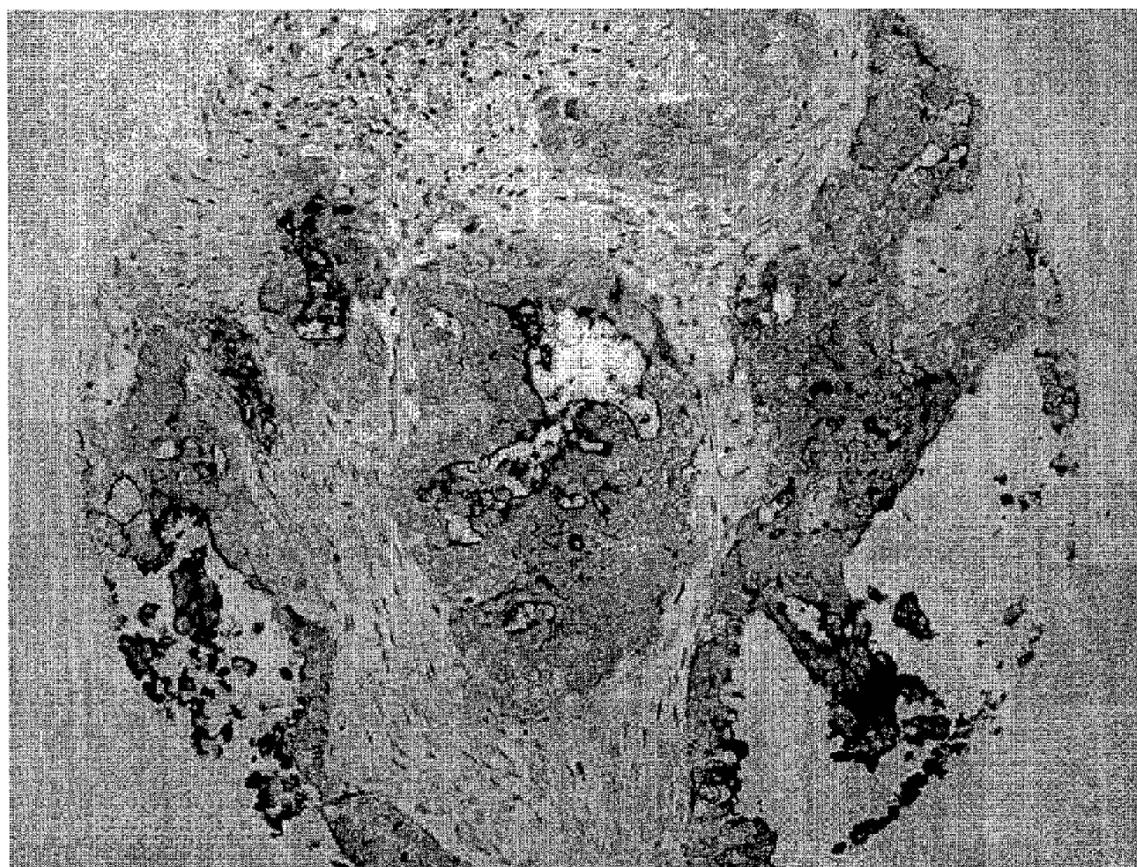


FIGURA 3E

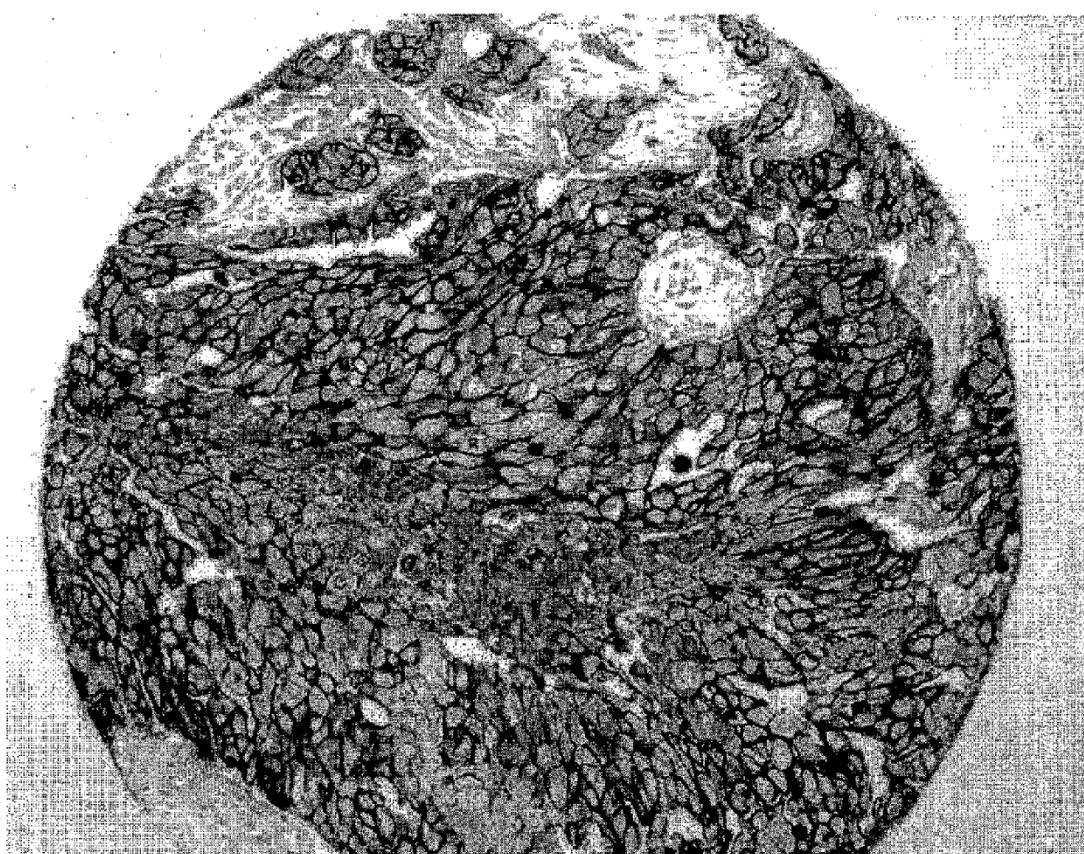


FIGURA 3F

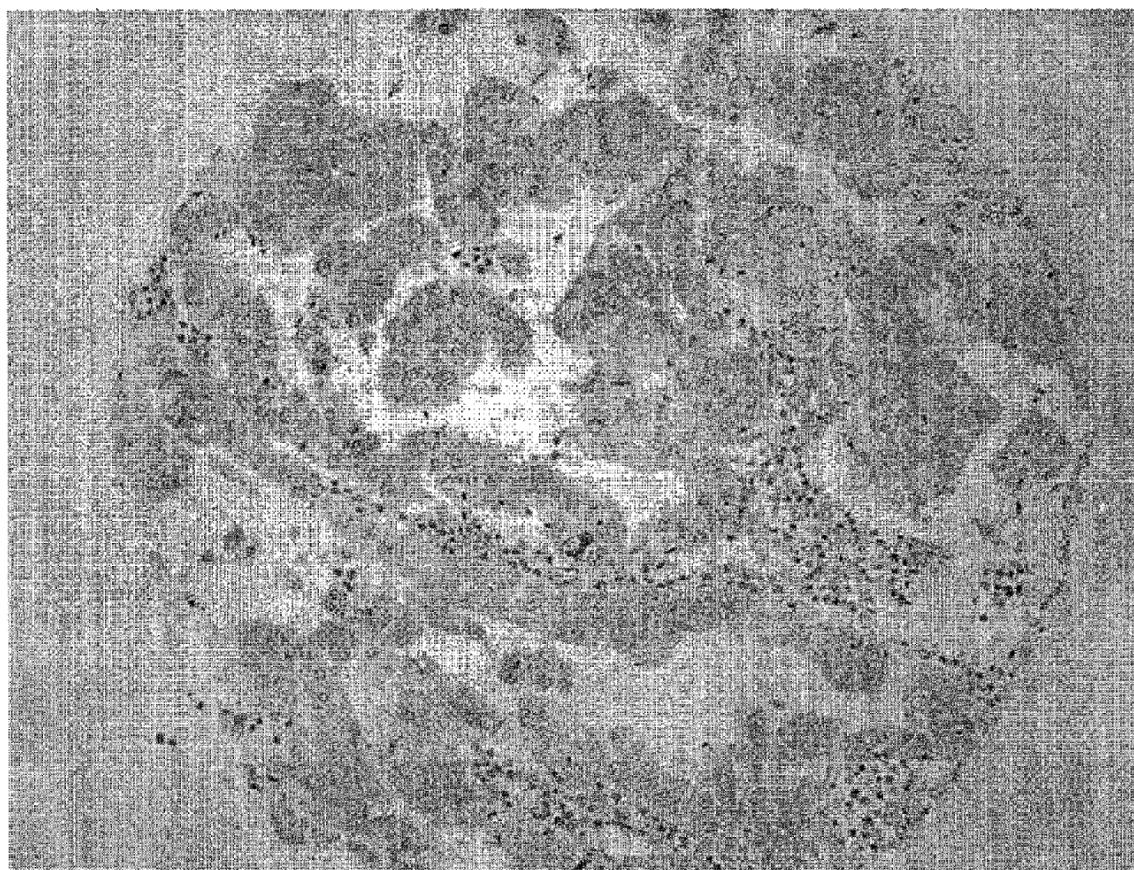


FIGURA 3G

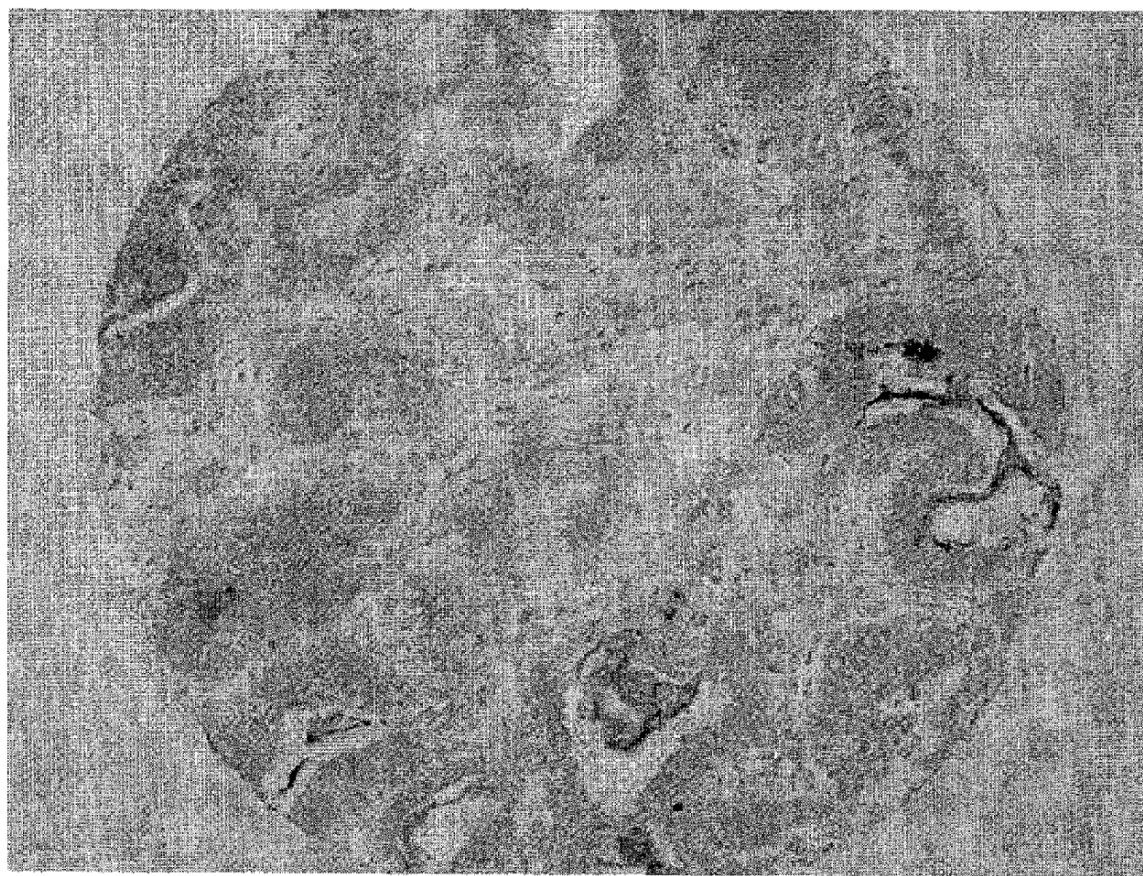


FIGURA 3H

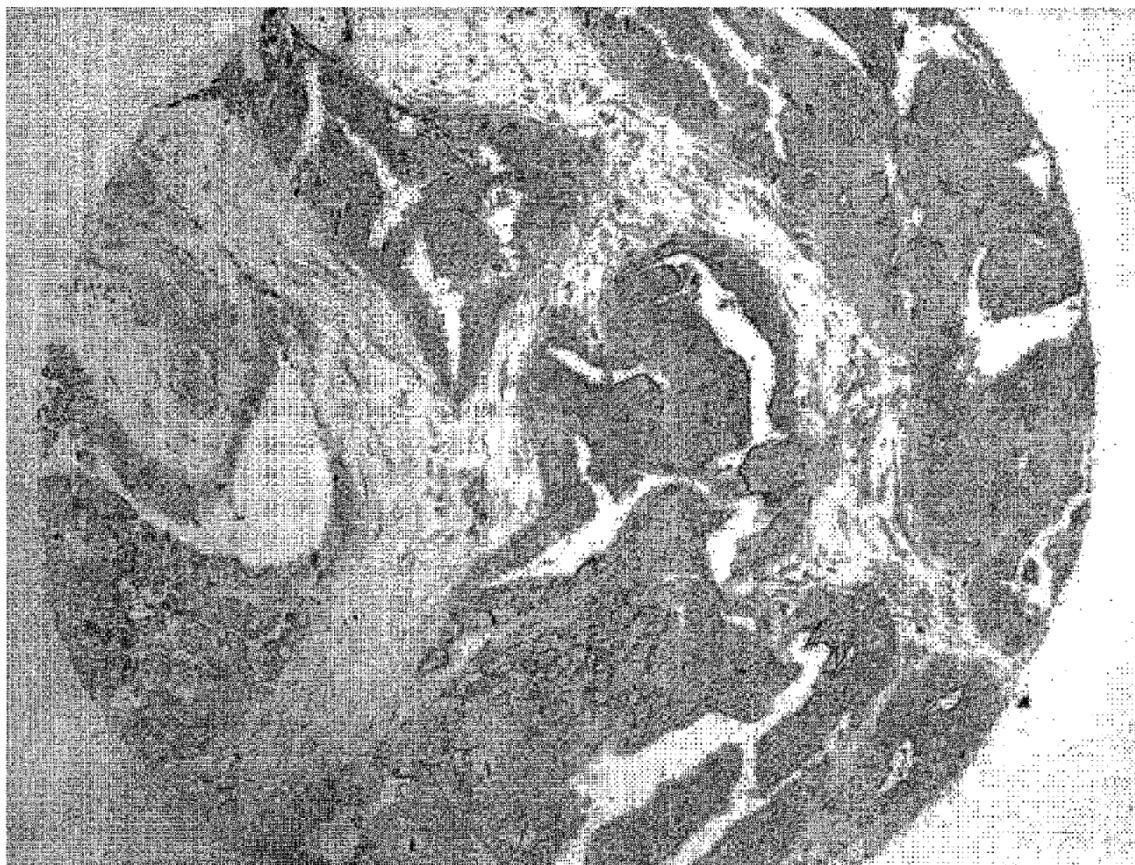


FIGURA 3I



FIGURA 3J

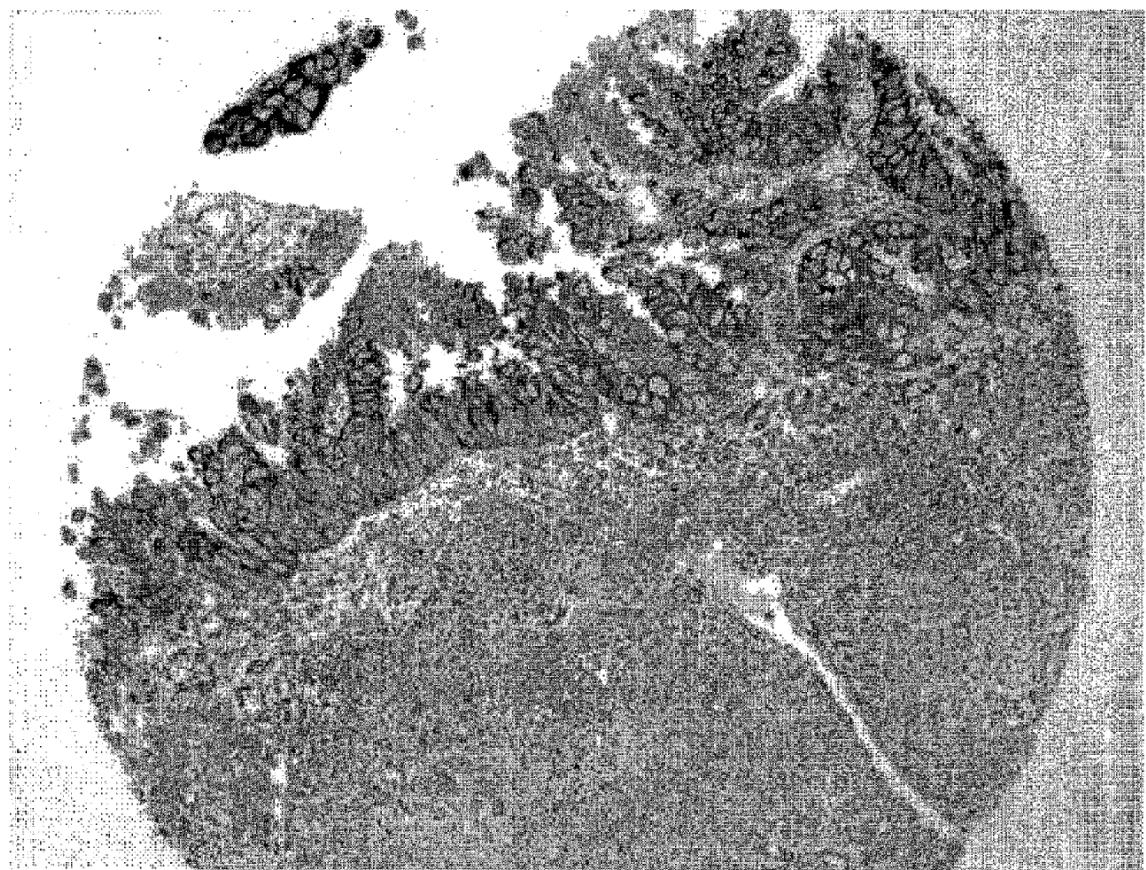


FIGURA 3K

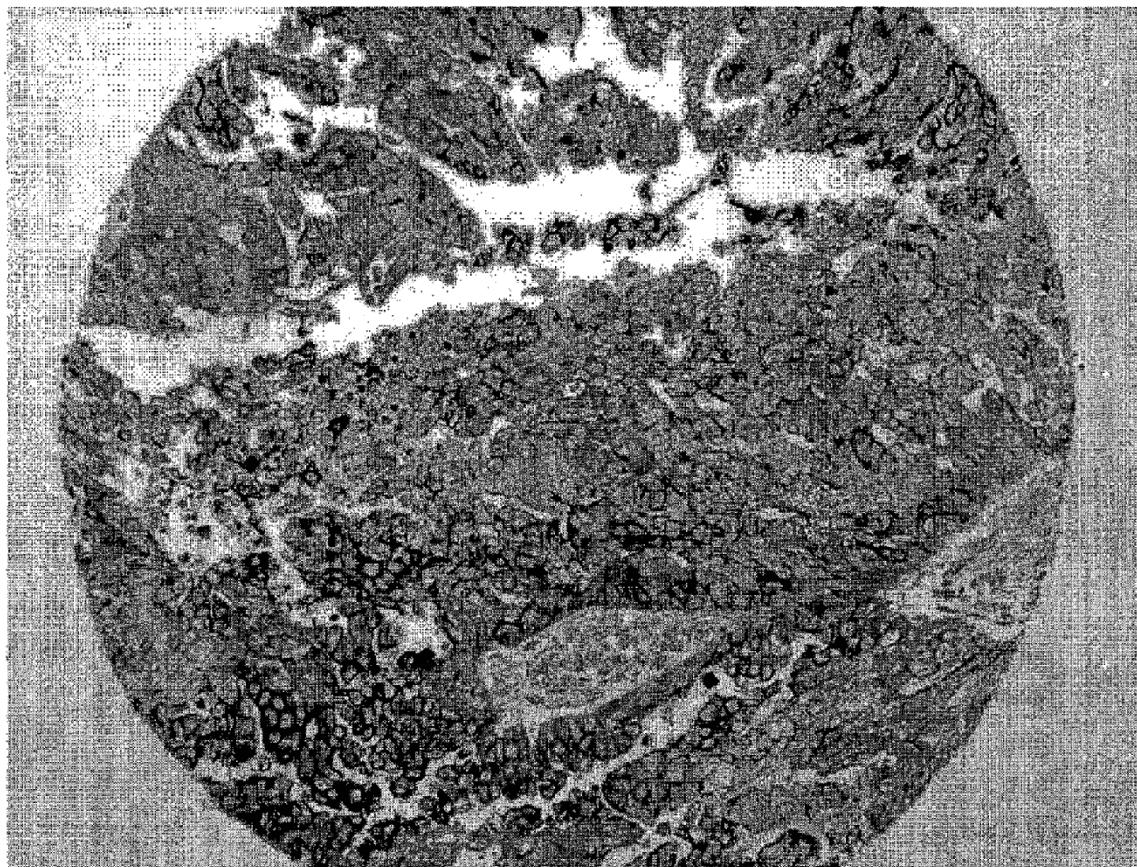


FIGURA 3L

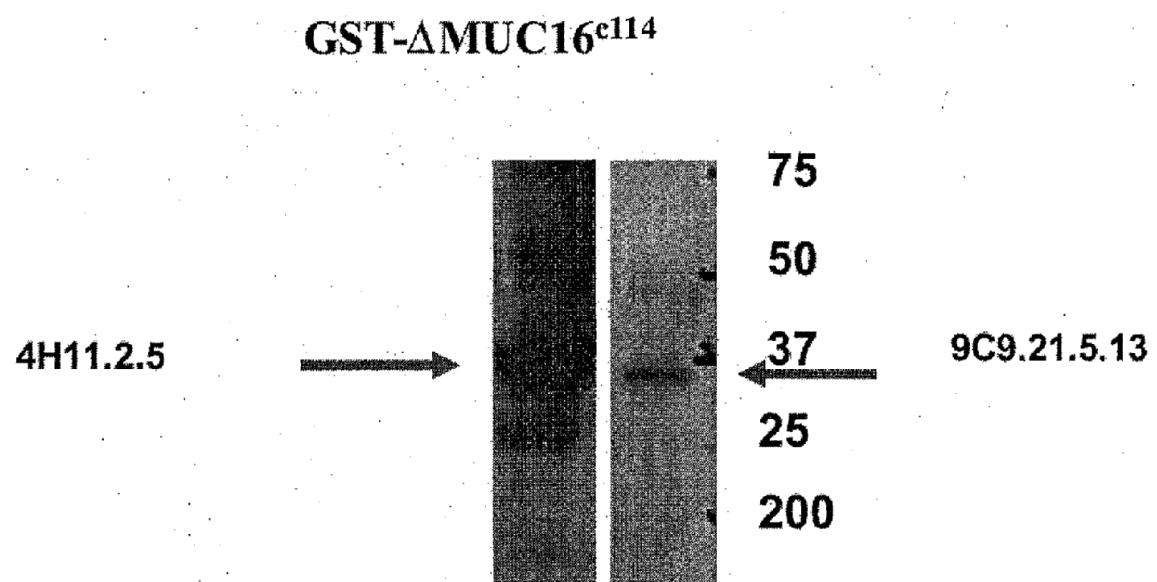


FIGURA 4A

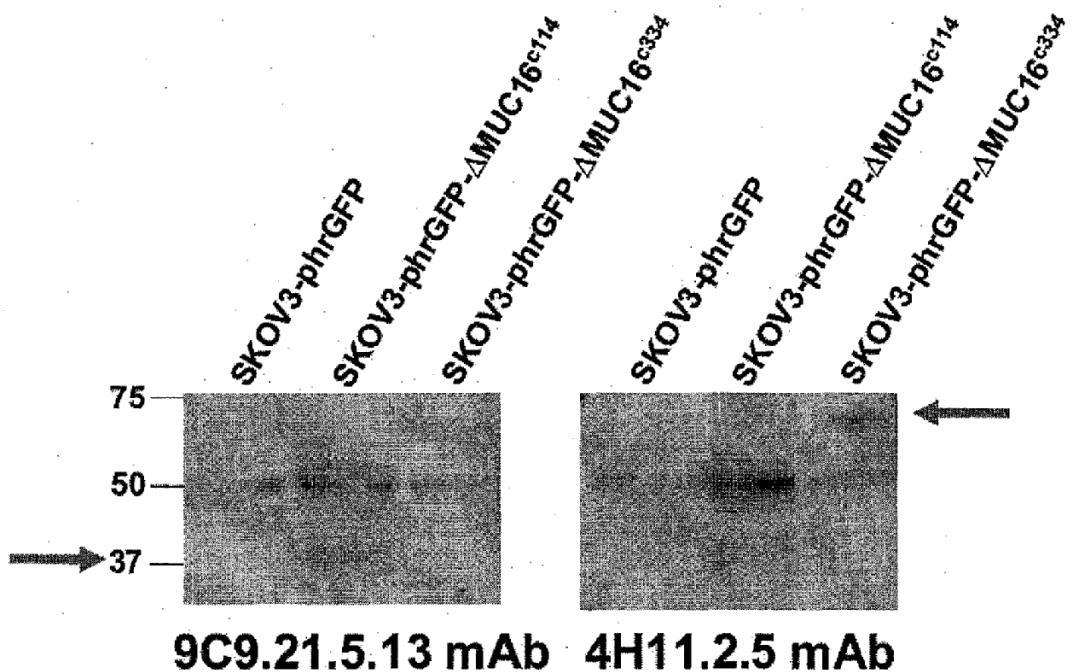


FIGURA 4B

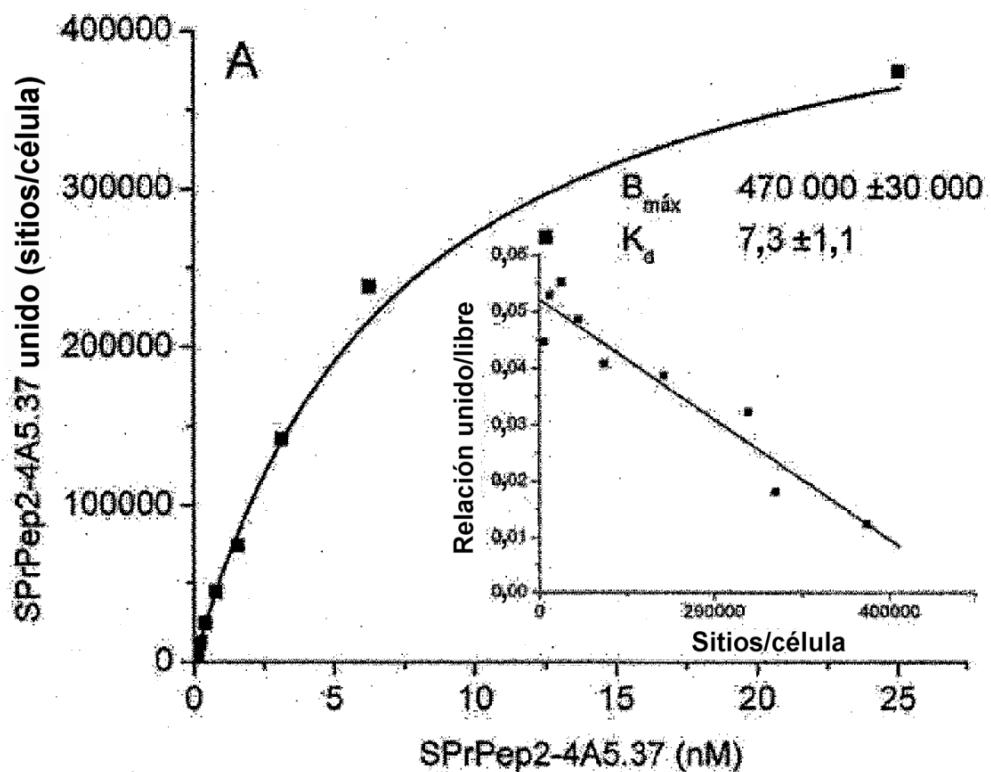


FIGURA 5A, PANEL A

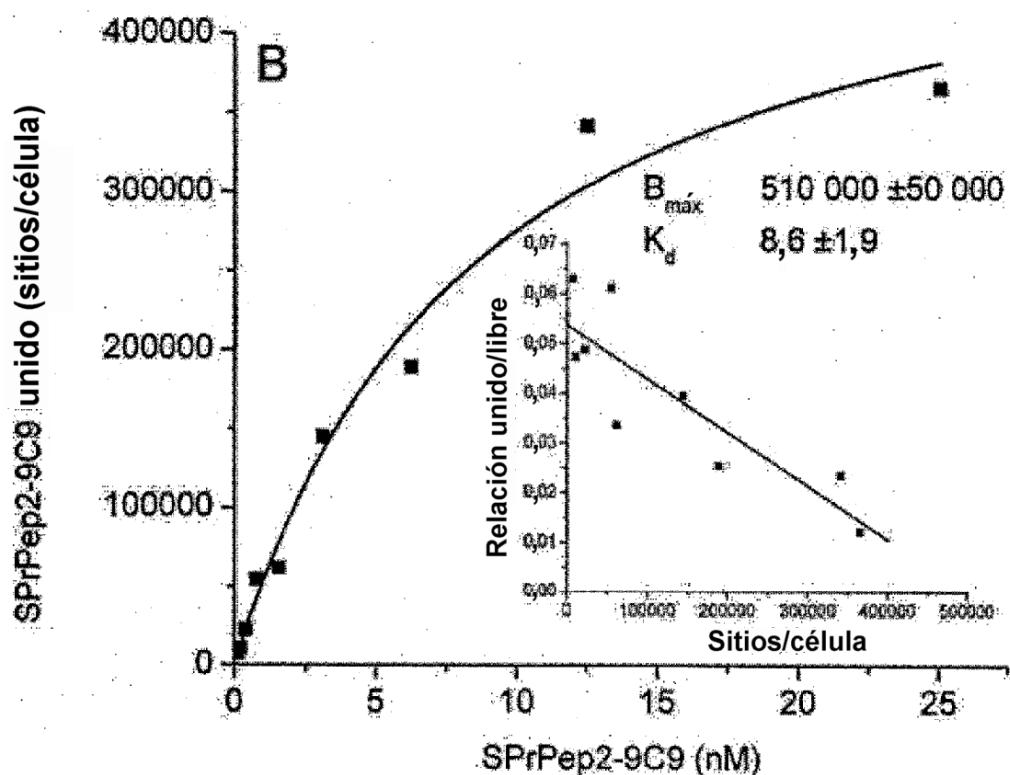


FIGURA 5A, PANEL B

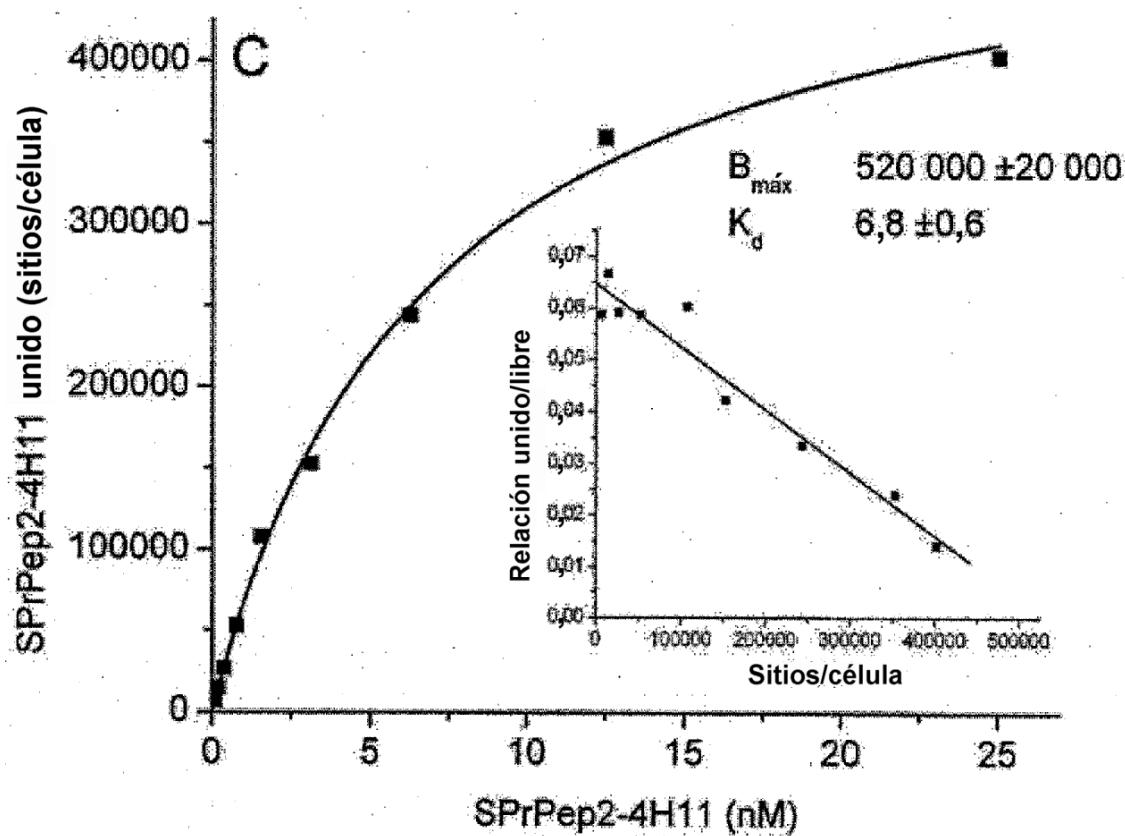


FIGURA 5A, PANEL C

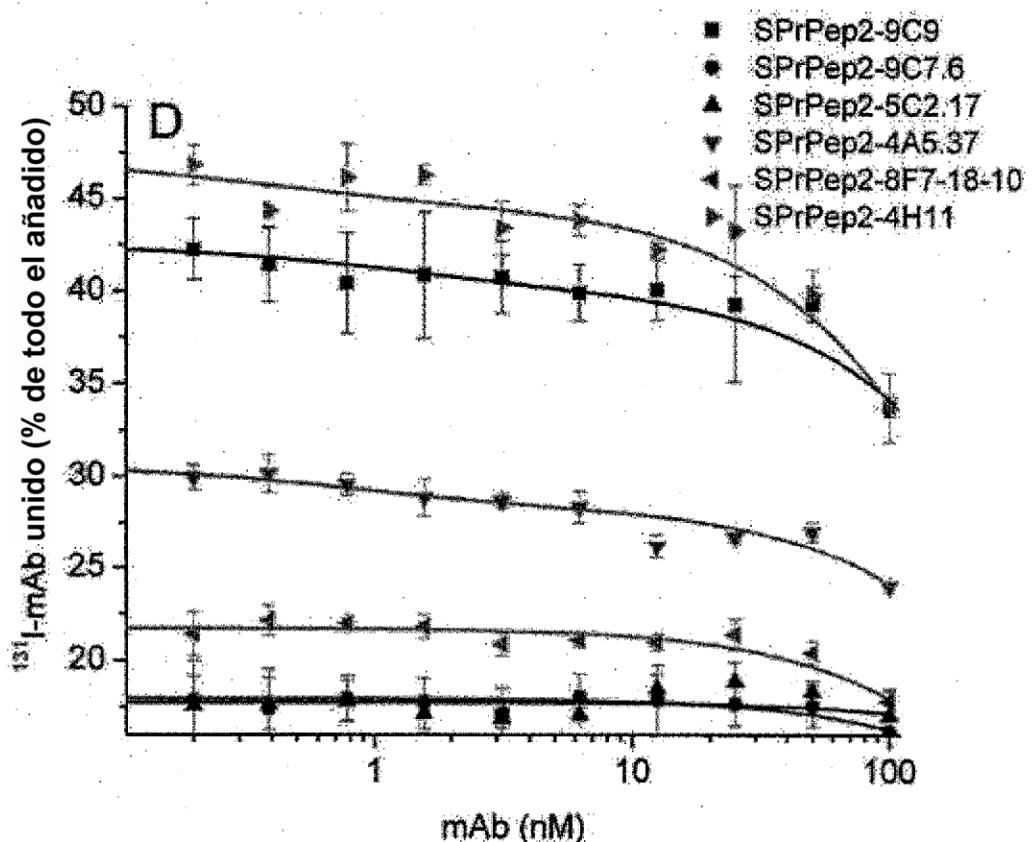


FIGURA 5A, PANEL D

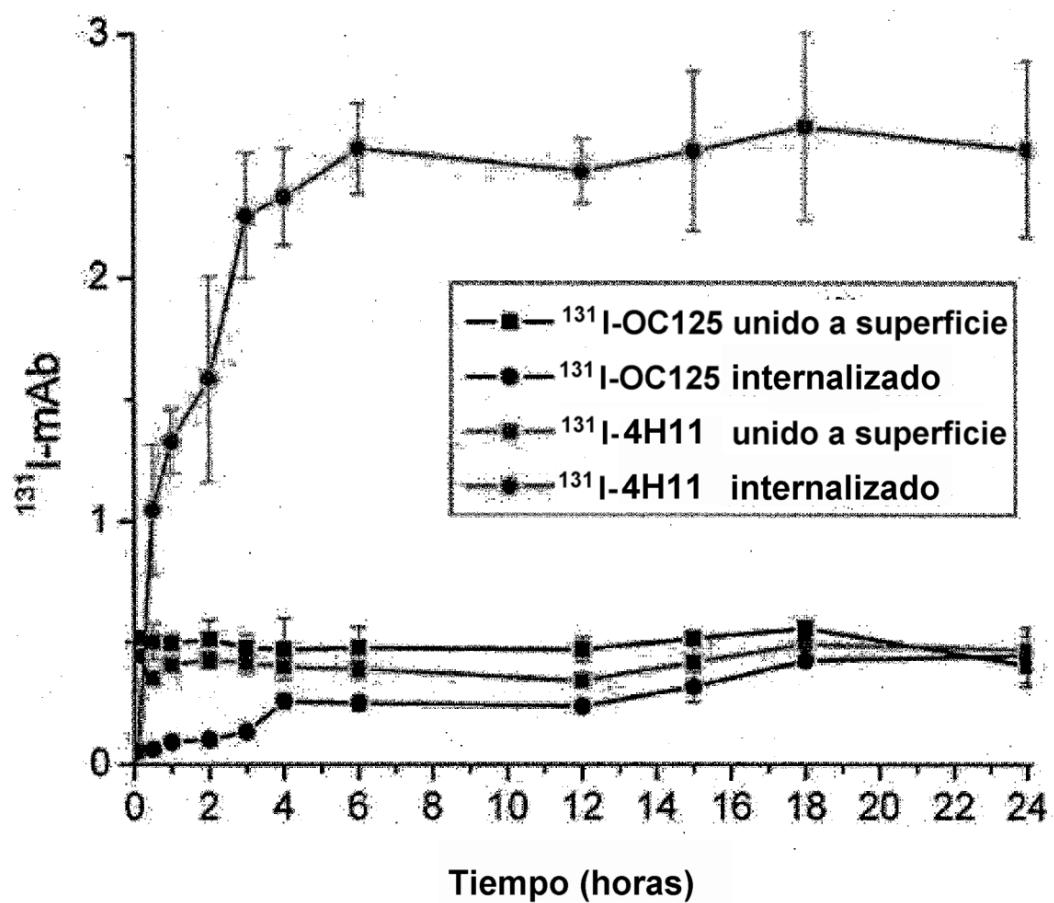


FIGURA 5B

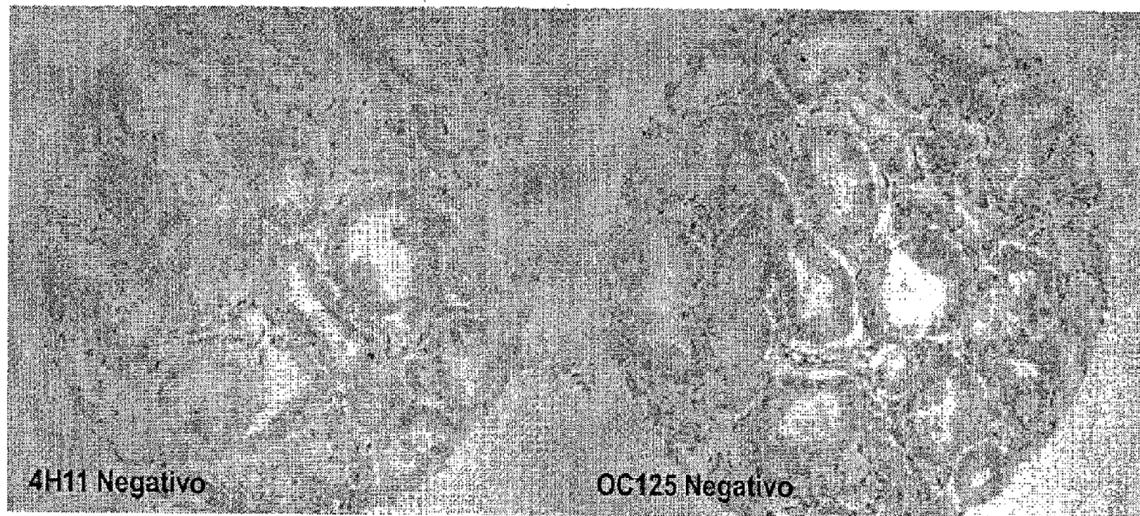


FIGURA 6A

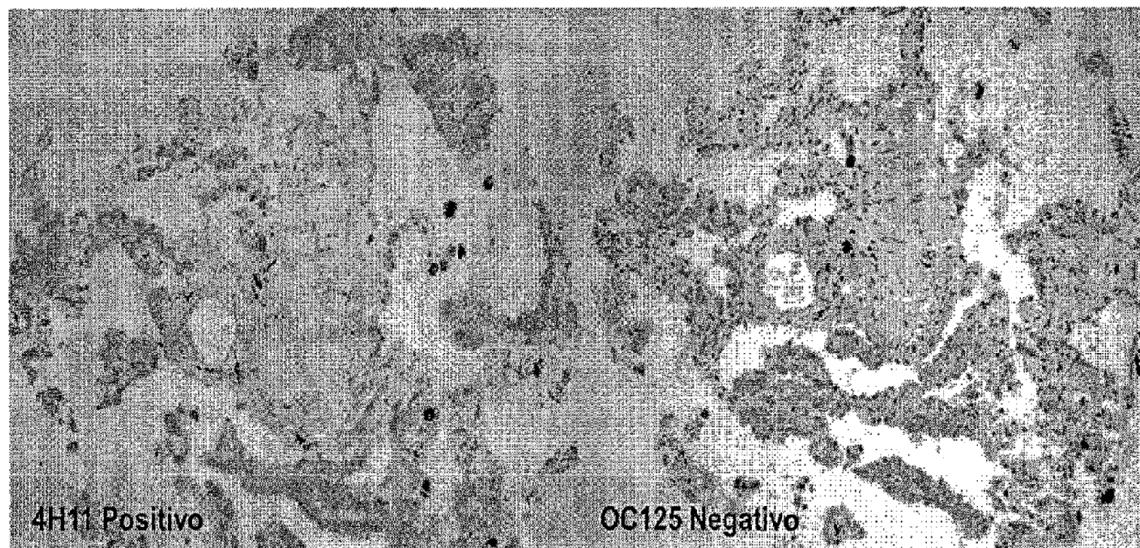


FIGURA 6B

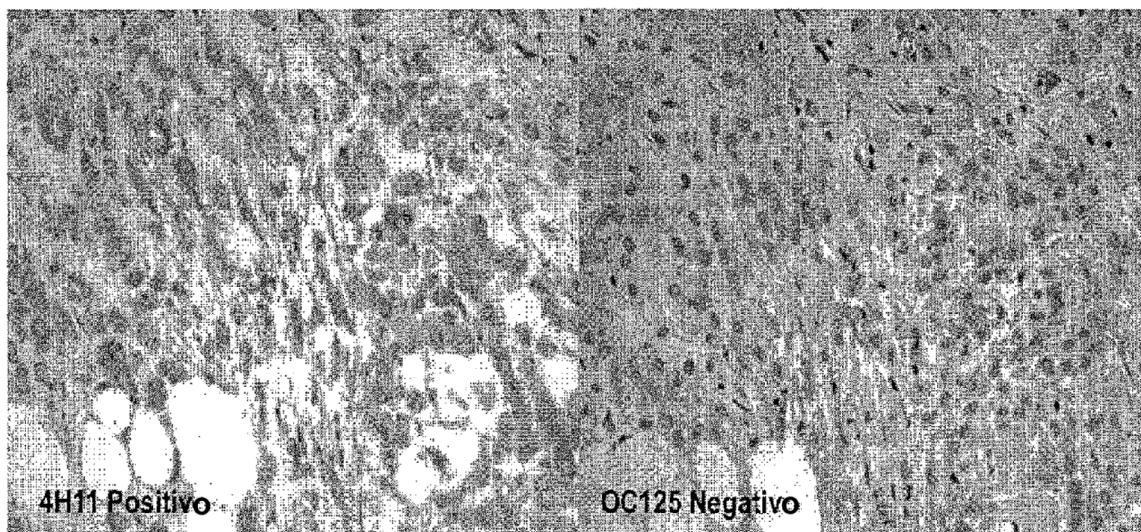


FIGURA 6C

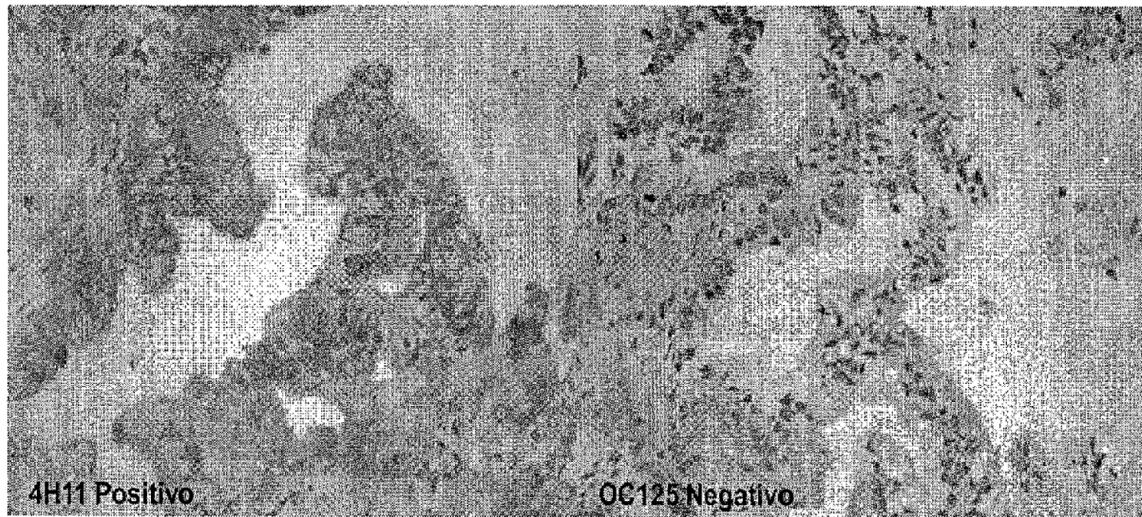


FIGURA 6D

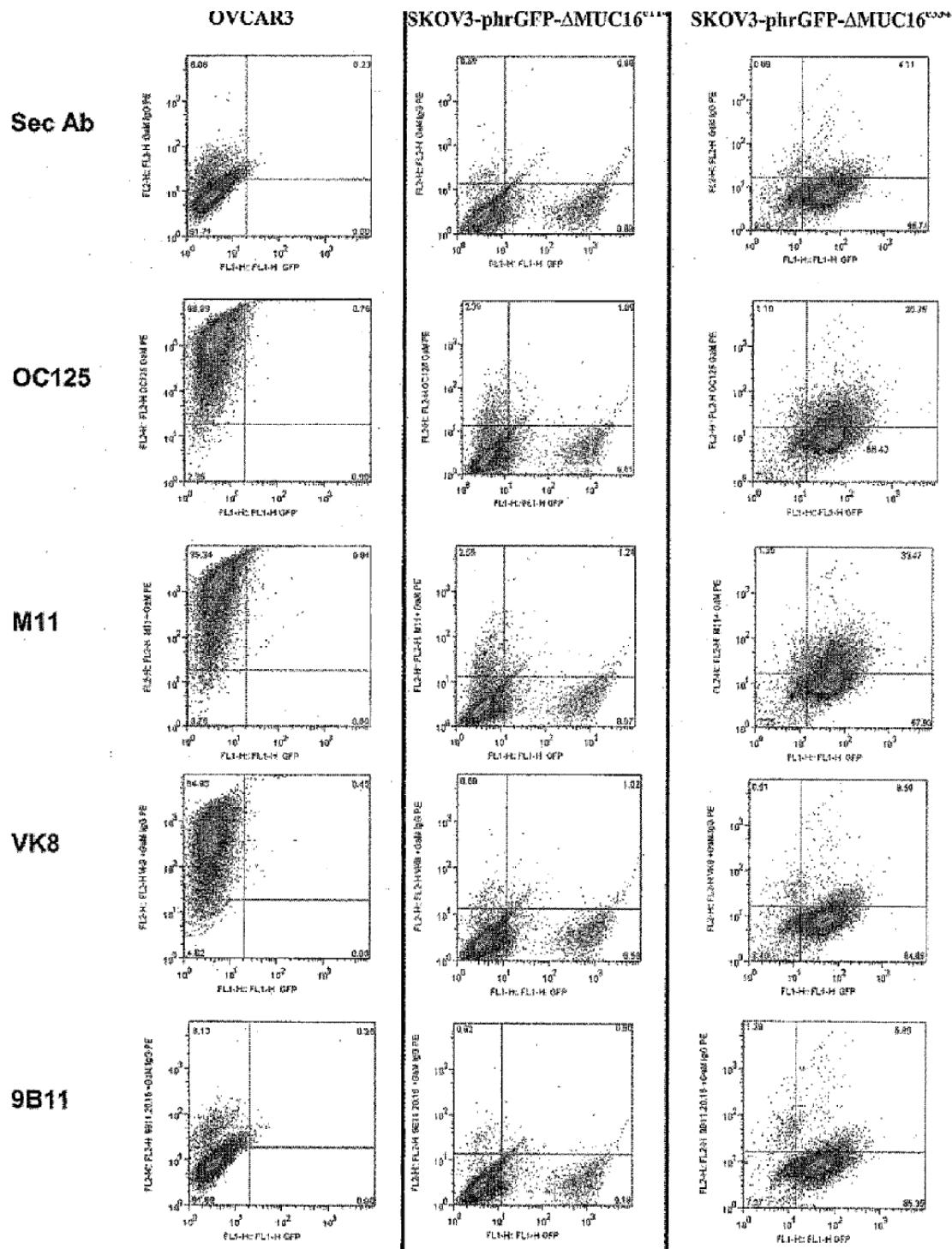


FIGURA 7, PÁGINA 1 DE 2

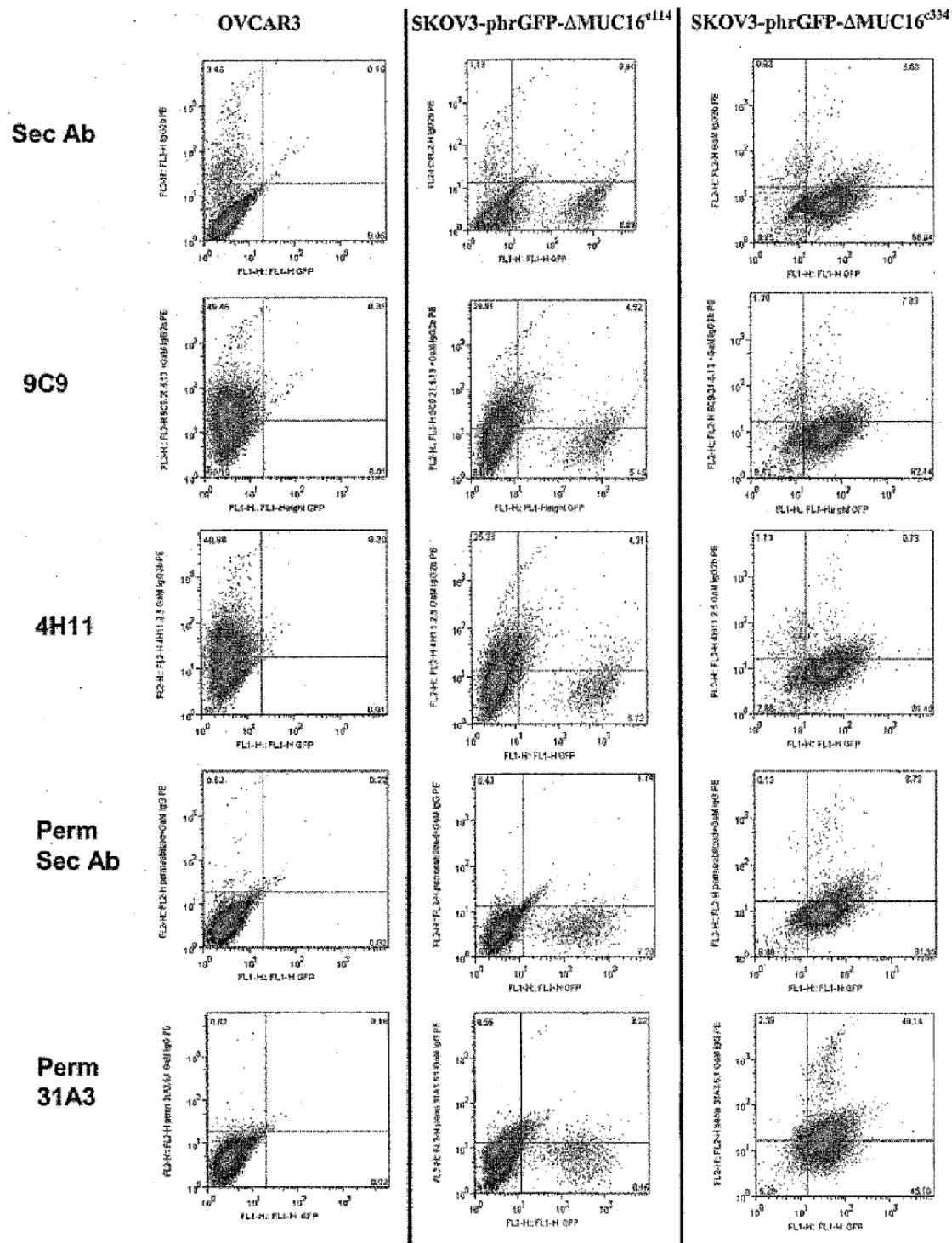


FIGURA 7, PÁGINA 2 DE 2

(A) 4A5 VH (SEQ ID NO:04)

gtaaaggctggaggagtccggggaggcttcgttaagcctggagggtccctcaaaatctcctgtcagccctctggattcac
tttcagaaactatgccatgtctgggttcgcctgagtcggagatgaggctggagtgaggctggatcccaaccattagcagtgc
gtggttacatcttctattctgacagtgtgcagggacgattcaccattccagagacaatgccaagaacaccctccacttg
caaatggcagtcgaggctggggacacggccatgtattactgtgcaggcagggatttggtaactacggtgattacta
tgctatggactactggggccaagggaccacggtcacccgtctectca

(B) 4A5 VL (SEQ ID NO:05)

gacattgagctaccaggactccatcctccctggctgtgtcagcaggagagaaggctactatgagctcaaattccaggta
gagtctgtcaacagtagaaaccgaaagaaccaggatgtggcttggtaaccagcaaaaaacaggacagtctctgaactgtga
tctactgggcatccactcgcaatctggggccctgatcgcttacaggcagtggatctgggacagatttcaacttcacc
atcagcagtgtcaggctgaagacctggcagtttattactgccagcaatcttataatctactcacgttcggctctggac
caaqtggagatcaaaccgg

(C) 4H11 VH (SEQ ID NO:06)

(P) 4H11 VL (SEQ ID NO:07)

(L) 4HII VI (SEQ ID NO:7)
gacattggactcaccaggactctccatccctccctggctgtgcaggagagaaggtaactatgagctgaaatccagtc
gagtctgtcaacagtagaacccggaaagaaccaggatgtggcttgtaccagcaaaaaccaggacagtctctgtactgtca
tctactggccatccactaggcaatctggagtcctgtatcgcttacaggcagtggatctggacagatttactcttacc
atcagcagtgtgcaggctgaagacctggcagtttattactgccagcaatcttataatctactcacgttcggctctggac
caagctgtgggtcaacccgg

(E) 9B11 VH (SEQ ID NO:08)

(F) 9B11 VL-A (SEQ ID NO: 99)

(+) 5'UTR VELA (SEQ ID NO:7)
gacatttagctcacccgtctccatccctccctggctgtgcggcaggagagaaggctactatgagctgaaatccaggca
gagtctgtcaacagtagaacccggaaagaaccaggatgtggcttgtaccagcaaaaaccaggacagtctccgtaaactgtca
tctactggccatccactaggcaatctggagtcctgtatcgcttacaggcagtggatctggacagatttacttcacc
atcagcagtgtcgaggctgaagacctggcagtttattactgccagcaatcttataatctactcacgttcggctctggac
caagctcgaggctaaacgg

(G) 9B11 VL.B (SEQ ID NO:19)

(3) 5'UTR VE-1 (SEQ ID NO:17)
gacattggactcaccaggctccaaagctcttgatctacaagggttccaaaccgatttctggggtccagacaggttcag
tggcgttggatcaggacagatccacactcaagatcagcagactggaggctgaggatctggagttattactgttttc
aagggttccatgtttccgtggacgttctggggaccaagctggagatcaaccq

FIGURA 8 (1 de 2)

(H) 24B3-VH (SEQ ID NO:11)

GAGGTGAAGCTGGAGGAGTCAGGACCTGAACCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTA
CTCATTACTGGTACTTTATGAACGGTGAAGCAGACCCATGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTT
ACAATGGTGTACTTCTACAATCAGAAGTTACGGGCAAGGCCACAATGACTGTAGACAATCCTTACACCAGCCCCAC
ATGGAGCTCTGAGCCTGACATCTGAGGAACCTGAGTCTATTATTGTGGAAAGGGGAATTACTACGGCCCCTTGTGATTA
CTGGGGCCAAGGGACCGTACCGTCTCCTCA

(I) 24B3-VL (SEQ ID NO:12)

GACATTGAGCTCACCCAGCTTCCATCTTATCTTGTGCATCTCCCTGAAGAAACCATTAATTGAGCTGGGAAAGTAA
GAGCATTAGCAAATATTAGCTGGTATCAAAAGAAACCTGGGAAACTAATAAGCTTCTTATCTACTCTGGATCCACTT
TGCAATCTGGAATTCCATCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGCT
GAAGATTGCAATGATTACTGTCAACACGATAATGAATACCCGTGGACGTTGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAA
ACGGGCGGCGCA

FIGURA 8 (2 de 2)

(A) MUCINA-16 de *Homo sapiens* (GenBank NP_078 966) (SEQ ID NO:13)

1 mlkpsglpgs ssprtslmtg srstkatpem dsrgltgatls pktstgaiivv tehtlpfts
 61 dktlasptss vvgrttqslg vmssalpeste srgmthseqr tpspslspqvn gtpsrnypa
 121 smvsglsspr trtsstegnf tkeastytlt vettsgpvte kytvptetst tegdstetp
 181 dtryipvkit spmktfadst askenapvsm tpaettvtds htprgrtnpsf gtlyssfld
 241 spkgtpnsrg etslelilst tgypfsspep gsaghsrist saplssasav ldnkisets
 301 fsgqsltspl spgvpearas tmpnsaipfs mtlsnaetsa ervrstissl gtpsistkg
 361 aetiltfhaf aetmdipsth iaktlasewl gspgtlggts tsaltnnspes ttlvseetn
 421 hhstsgkete gtlntsmpl etsapgeese mtatlvpvlg fttldskirs psqvssshp
 481 relrttgsts grqssstaah gssdilratt sstskasswt sestaqqfse pqhtqwvet
 541 psmkterppa stsvaapitt svpsvvsgft tlktsskigi wleetsadtl igestagpt
 601 hqfavptgis mtggsstrgs qgtthlitra tassetsadl tlatngvpvs vspavskta
 661 gssppggtkp sytmvssvip etsslqssaf regtslgltp lntrhpfssp epdsaghtk
 721 stsipllssa svledkvsat stfshhkats sittgtpeis tktpkssavl ssmtlsnaa
 781 spervrnats plthpspsge etagsvltls tsaettdspn ihptgtltse ssespstls
 841 psvsgvkttf ssstpsthlf tsgeeteets npsvsqpets vsrvrttlas tsvptpvfp
 901 mdtwptrsaaq fssshlvsel ratsstsvtn stgsalpkis hltgtatmsq tnrdfndns
 961 apqsttwpet sprfktglps atttvstsat slsatvmvsk ftspatssme atsirepst
 1021 ilttettngp gsmavastni pigkyiteg rldtshlpig ttassetsmd ftmakesvs
 1081 svspsgsmda agsstpgrts qfvdtfsddv yhltsreiti prdtssalt pqmtathpp
 1141 pdpgsarstw lgilssspss ptpkvttmsst fstqrvttsm imdtvetsrw nmpnlpstt
 1201 ltpsniptsg aigkstlvpl dtpspatsle aseggplts typestnps ihlgahass
 1261 spstikltma svvkpgsytp ltfpsieti hvstarmays sgsspemtap getntgstw
 1321 pttyitttdp kdtssaqvst phsvrtrtt enhpktesat paaysgspki ssspnltsp
 1381 tkawtitdtt ehstqlhytk laekssgfet qsapgpvsvv iptsptigss tleltsdvp
 1441 eplvlapseq ttitlpmatw ltslsteema stdldissps spmstfaifp pmstphel
 1501 kseadtsair ntdsttldqh lgirslgrtg dltpvptpl tttwtsvih stqaqdtls
 1561 tmspthvtqs lkdqtsipas asphsltevy pelgtqgrss seattfwkps tdtlsreie
 1621 gptniqstpp mdnttgsss sgvtlgiahl pigtsspaet stnmalerrs statvsmag
 1681 mgllvtsapg rsisqslgrv ssvisestte gvttdsskgss prlntqgnta lsslepsy
 1741 egsgmstsipl ltsspttpdv efiggstfwt kevttvmtsd iskssartes ssatlmsta
 1801 gstdengkek lrtasmdlps ptpsmevtpw isltlsnapn ttdsldlshg vhtssagtl
 1861 tdrslntgvt rasrlengsd tsskslsmgn sthtsmtye ksevsssihp rpetsapga
 1921 tltstpgnr aisltlpfss ipveevistg itsgpdinsa pmthspitpp tivwtstgt
 1981 eqstqplhav ssekvsvqtq stpyvnsvav saspthensv ssgsstsspy ssaslesld
 2041 tisrrnaits wlwdltslp tttwpstsls ealssghsgv snpssttgef plfsaasts
 2101 akqrnpetet hgpqntaast lntdassvtg lsetpvgas ssevplpmai tsrsvsogl
 2161 sestanpslg tassagtklt rtislpstes lvsfrmknkp wtvsiplgsh ptntetsi
 2221 vnsagppgls tvasdvidtp sdgaesiptv sfspspdtev ttishfpekt thsfrtiss
 2281 theltsrvtp ipgdwmssam stkptgasps itlgerrtit saapttspiv ltasftets
 2341 vslndnettvk tsdildarkt nelpsdssss sdlintsias stmdvktas isptsisgm
 2401 assspslfss drpqvptstt etntatpsv ssntysldgg snvggtpstl ppftithpv
 2461 tssallawsr pvrftstmvs tdtasgenpt ssnsvvtsvp apgtwtsgs ttdlpamgf
 2521 ktspageahs llastiepat aftyphlsaa vtvgsatsea slittseska ihsspqtpt

FIGURA 9 (página 1 de 6)

2581 ptsganwets atpesllvvt etsdttltsk ilvtdtilfs tvstppskfp stgtlsgas
 2641 ptllpdtpai pltateptss latsfdstpl vtiasdslt vpettltmse tsngdalvl
 2701 tvsnpdrsip gitiqggvtes plhpsstspk kivaprntt egsitvalst lpagttgs
 2761 fsqssenset talvdssagl erasvmppltt gsqgmmassgg irsgsthsdg tktfsslpl
 2821 mmpgevtams eittnrltat qstapkgipv kptsaesgl1 tpvsassspk kafaslta
 2881 ptwgipqst1 tfeffsevpsl dtksaslptp gqslntipds dastasssls kspeknpra
 2941 mmtstkaisa ssfqstgfe tpegsaspms agheprvpts gtgdpryase smsydpdk
 3001 ssamtstsla sklttlfstg qaarsgssss pislsteket sflsptasts rktslflgp
 3061 marqpnilvh lqtsaltlsp tstlnmsqee ppelstssqti aeeegtttaet qtlftpse
 3121 ptsllpvssp teptarrkss petwassivs paktslvett dgtlvttikm ssqaaqgns
 3181 wpapaeetgs spagtspgsp emsttlkims skepsispei rsvrnrspwk tpevvpm
 3241 tvepvtlqst algsgstsis hlptgtspt ksptenmlat ervslspsp eawtnlysg
 3301 pggrqslat mssvlespt arsitgtgqq spelvsktt gmeftsmwhgs tggtdgh
 3361 slstssnile dpvtspnsvs sltdkskhkt etwvsttaip stvlnnkima aeqqtsrsv
 3421 eaysstssws dqtsgsdtl gaspdvtnt1 yitstaqts lvslpsgdqg itsltnpsg
 3481 ktssassvts psigletlra nvsavksdia ptaghlsqts spaevsildv ttaptsgis
 3541 tittmgtnsi sttpnpevg mstmdstpat errrtstehp stwsstaasd swtvtdm
 3601 lkvarspgti stmhittsfla steldsmst phgritvigt slvtpssdas avktetsts
 3661 rtlspdttt stpistfsrv qrmsisvpdi ltswtpsst eaedvpvsmv stdhastkt
 3721 pntplstflf dslstldwdt grslssatats tsapqgattp qeltletmis patsqlpfs
 3781 ghitsavtpa amarssgvtf srpdptskka eqtstqlptt tsahpgqvpr saattldvi
 3841 htaktpdatf qrqgqtalatt earatsdswn ekekstpsap witemmnsvs edtikevts
 3901 ssvlrltnt1 dinlesgtts spswksspye riapsesttd keaihpstnt vettgwts
 3961 ehashstipa hsasskltsp vvttstreqa ivsmsttwp estrartepn sfltielrd
 4021 spymdtsstt qtsiisspgs taitkgprte itsskriss flaqsmrssd spseaitrl
 4081 nfpamtesgg milamqtspp gatslsaptl dtsataswtg tplatzqrft ysektlfs
 4141 gpedtsqspsp psveetssss slvpihatts psnilltsqg hpsstppvt svflsetsg
 4201 gktttdmsris lepgtslppn lsstageals tyeasrdtka ihhsadtavt nmeatssey
 4261 pipgktpsk atsplvtshi mgditsstsv fgssetteie tvssvngqlq erstsqvas
 4321 atetstvith vssgdatthv tktqatfssg tsissphqfi tstdntftdvs tnpstslim
 4381 essgvtittq tgptgaatqg pylldtstmp yltetplavt pdfmqsektt liskgpkdv
 4441 wtspssvaet sypssltpf1 vttippatst lqgqhtsspv satsvltsql vkttdmlnt
 4501 mepvttnspqn lnnpsneila tlaattdiet ihpsinkavt nmgtassahv lhstlpvss
 4561 pstatspmv assmgdalas isipgsettd iegeptsslt agrkenstlq emnsettesn
 4621 ilsnvsvgai teatkmevps fdatfippta qstkpfdifs vassrlsnsp pmtisthmt
 4681 tqtgssgats kiplaldtst letsagtpsv vtegfaahski ttamnndvkd vsqtnppfq
 4741 easspssqap vlvttlpssv aftpqwhsts spvsmssvlt sslvktagkv dtsletvts
 4801 pqsmstl1 isvtsaattd ietthpsint vvtvngttgs afeshstvsa ypepskvts
 4861 nvttstmedt tisrsipkss kttrtetett ssltpklret sisqettsst etstvpyke
 4921 ttagtevsrt dvtssstsf pgpdqstvsl distetntr1 stspimtesa eitittqg
 4981 hgatsqdtft mdpsnntpqa gihsamthgf sqldvtlms ripqdvswwts ppsvdktss
 5041 ssflssspamt tpslisstlp edklsspmts lltsglvkit dirltrlepv tsslpnfss
 5101 sdkilatskd skdtkeifps intetnvka nnsgheshsp aladsetpka ttqmvitt
 5161 gdapapstsmpl vhgsssettni kreptyfltp rlretstsqe ssfptdtsfl lskvptgti

FIGURA 9 (página 2 de 6)

5221 evsstgvnss skistpdhdk stvppdtftg eiprvftssi ktksaemtit tqasppesa
 5281 hstlpldtst tlsqggthst vtqgfpysv ttimgmfpn vswmtpvve etssvsslm
 5341 spamtspspv sstspqips splpvatalpt svlvttndl gttspesvts sppnlssit
 5401 erpatykdta hteamhhst ntavtnvgts gsghksqssv ladsetskat plmsttstl
 5461 dtsvststpn isqtnqiqte ptaslsprlr esstsekts ttetntafsy vptgaitqa
 5521 rteisssrts isdldrptia pdistgmitr lftspimtks aemtvttqtt tpgatsqgi
 5581 pdwtsttlfq ggthstvsqg fphseittlr srtpgdvswm tppveetss gfslmfspm
 5641 spspvsstsp esipssplpv talltsvlt ttnvlgttsp epvtssppnl ssptqerlt
 5701 ykdtahteam hasmhtntav anvgtsisgh esqssvpads htskatspmg itfamgdt
 5761 ststpaffet riqtestssl ipglrdtrts eeintvtets tvlsevpptt ttevsrtev
 5821 tssrttisgp dhskmspyis tetitrlstf pfvtgstema itnqtpgigt isqatltld
 5881 sstaswegth spvtqrphs eetttmsrst kgvswqspss veetsspssp vplpaitsh
 5941 sly savsgss ptsalpvtsl ltsgrrktd mldthselvt ssbpsassfs geiltseas
 6001 ntetihfSEN taetnmgttn smhklhssvs ihsqpsgtp pkvtgsmmmed aivststpg
 6061 petknvdrds tspltpelke dstalvmnst tesntvfssv sldaatevsr aevtyydpt
 6121 mpasaqstks pdispeasss hsnsppltis thktiatqtg psgvtsgql tldtstiat
 6181 agtpartqd fvdsettsvm nnndlndvlkt spfsaeeans lssqaplvt tpspvtst
 6241 qehstsslvs vtsvptptla kitdmdtnle pvtrspqnlr ntlatseatt dthtmhpsi
 6301 tavanvgtts spnefyftvs pdsdpkykats avvitstsgd sivstsmprs samkkiese
 6361 tfsliifrlre tstsqkigss sdtstvfdka ftaattevsr teltsssrts iqgtekptm
 6421 pdtsstrsvtm lsfagltks eertiatqtg phratsqgqtl twdtsittsq agthsamth
 6481 fsqldlstlt srveyisgt sppsvektss sssllspai tpspvppti pesrppspv
 6541 ltslptsglv kttdmblasva slppnlgsts hkipttsedi kdtekmpst niavtnvg
 6601 tsekesyssv payseppkv payseppkv payseppkv payseppkv payseppkv
 6661 gtstsqdpi steksaavlkh lttgatetsr tevassrrts ipgpdhstes pdistevip
 6721 lpislgites snmtiitrtg pplgstsqgt ftldpttss ragthsmatq efphsemmt
 6781 mmkdpeilsw tippsiekts fssslmpspa mtsppvsstl ptkihhttp mtslltpsl
 6841 mtttgtsp epttssppnl sstsheilts dedttaiem hpststaatn vettssghg
 6901 qssvladsek tkatapmdtt stmghttvst smsvssettk ikrestyslt pglretsis
 6961 nasfstdtsi vlsevptgtt aevsrechts sgrtsipgps qstvlpeist rtmtlrfas
 7021 tmtesaemti ptqtpgsgt sqdtltldts ttksqakths tltqrfphse mttsmsrgp
 7081 dmswqsspsl enpsslpsll slpattsp pp isstlpvtis ssplpvtis tsspvtt
 7141 lhtspelvts sppklshtsd erlttgkdt nteavhpstn taasnveips sghespsa
 7201 adsetskats pmfitstqed ttvaistphf letsriqkes isslspklre tgssvetss
 7261 iet savl sev sigatteisr tevtsssrts isgsaestml peisttrkii kfptspila
 7321 ssem tiktqt sppgstest ftldtsttsp lwithstmq rlphseittl vsrgagdvp
 7381 psslpvets ppssqlsasa mispspvsst lpasshsssa svtslltpgq vkttevlda
 7441 aepetsspps lsstsvetla tsevttdekk ihpfsntavt kvgtsssghe spssvlpds
 7501 ttktatsamgt isimgdtsvs tltpalsntr kiqsepassl ttrlretsts eetslatea
 7561 tvlsvkstga ttevsrteai fsrstsmsgp eqstmsqdis igtiprisas svltesakm
 7621 ittqtpses tle stlnlnt attpswveth siviqgfpb emttsmgrp ggvswpspp
 7681 vketsppssp lsplavtph pvtflahi ppsplpvtis ltsgpattt ilgtstepg
 7741 ssssslstts herltykdt ahteaavhpst ntggtnvatt ssgyksqssv ladsspmct
 7801 stmgdtvlt stpafletrr iqtelasslt pglressgse gtssgkfst vlskvptga

FIGURA 9 (página 3 de 6)

7861 teiskedvts ipgpaqstis pdistrtvsw fstspvmtes aeitmnhts plgattqgt
 7921 tltdsstsl tmthstisqg fshsqmstlm rrgpedvswm sppllektrp sfslmsspa
 7981 tspspvsstl pesissplp vtslltsgla kttdmlhkss epvtntspanl sstsveila
 8041 sevtttdtek hpssnrtvtd vgtsssghes tsfvladsqt skvtspmvit stmedtsvs
 8101 stpgffetsr iqteptssl lglrktsse gtslatemst vlsgvptgat aevsretevt
 8161 ssrtsisgfa qltvspetst etitrlptss imtesaemmi ktqtdppgst pesthtvdi
 8221 ttpnwveths tvtqrfshse mttslvrsppg dmlwpsqssv eetssassll slpattsp
 8281 vsstlvedfp saslpvtsll npglvittdr mgisreppts stsnlsstsh erlttledt
 8341 dtedmqpsth tavtnvrtsi sghesqssvl sdsetpkats pmgtytmge tsvsistsd
 8401 fetsriqiep tssltsglre tssserissa tegstvlsev psgattevsr tevissrgt
 8461 msgpdqftis pdistearitr ldstspimtes aesaitietg spgatsegtl tltdsttff
 8521 sgthstaspg fshsemstlm srtpgdvpwp slpsveeass vssslsspmam tstsffstl
 8581 esisssphpv talltgpvk ttdmlrtsse petssppnls stsaeilats evtkdrek
 8641 pssntpvnv gtviykhlp ssvladlvtt kptspmatts tlgnstsvts tpafpetmm
 8701 qptssltsgl reistsqets satersasls gmptgattkv srtealslgr tstdpgpaqs
 8761 ispeisteti tristplttt gsaemtitpk tghsgassqg tfldtssra swpgthsaa
 8821 hrsphsgmtt pmsrgpedvs wpsrpsvekt sppsslvsls avtspsplys tpsesshss
 8881 lrvtslftpv mmktdmldt slepvttspp smnitsdesl atskatmete aiqlsenta
 8941 tqmgtisarq efyssypglp epskvtpvv tsstikdivs ttipasseit riemestst
 9001 tptprests qeihsatkps tvpykaltsa tiedsmtqvm sssrgpspdq stmsqdist
 9061 vitrlstspi ktestemtit tqtgspgats rgltldst tfmsgthsta sqgfshsqm
 9121 almsrtpgdv pwlsbpsvee assasfslls pvmtssspvs stlpdsihss slpvtsllt
 9181 glvkttellg tssepetssp pnlsstsaei laitevtdt eklemtnvvt sgythesps
 9241 vladsvttka tssmgitypt gdtnvltstp afsdtsriqt ksklsltpgl metsiseet
 9301 satekstvls svptgattev srteaisssr tsipgpaqst mssdttsmeti tristpltr
 9361 estdmaitpk tgpsgatsqg tfldsssta swpgthsatt qrfpqsvvtt pmsrgpedv
 9421 wpsplsvekn sppsslvss svtspsplys tpsgsshssp vpvtslftsi mmkatdmdl
 9481 slepettsap nmnitsdesl aaskattete aihvfentaa shvettsate elyssspgf
 9541 eptkvispvv tssairdnmv sttmpgssgi trieiesmss ltpglretrt sqditsste
 9601 stvlykmpsg atpevsrtev mpssrtsiqg paqstmsldi sdevvtrlst spimtesae
 9661 tittqtgysl atsqvtlplg tsmtflsgth stmsqglshs emtnlmsrgp eslswtsp
 9721 vettrssssl tslpltttsl pvssttldss pssplpvtst ilpglvktte vldtssepk
 9781 ssspnlssts veipatseim tdtekihpss ntavakvrt ssvheshssv ladsett
 9841 psmgitsavd dttvftsnpa fsetripte ptfsltpgfr etstseetts itetsavly
 9901 vptsattevs mteimssnnri hipdsdqstm spdiitevit rlssssmmse stqmtittq
 9961 sspgataqst ltlatttapl arthstvppr flhsemstlm srspenpswk sslfvekts
 10021 sssllslpvt tpsvssstlp qsipsssfsv tslltpgmvk ttdtstepgt slspnlsqt
 10081 veilaasevt tdtekihpss smavtnvgtt ssghelyssv sihsepskat ypvgtppssm
 10141 etsistsmpa nfettgfeae pfshltsgfr ktnmsldtss vptntpssp gsthllqss
 10201 tdftrssakts spdwppasqy teipvdiitp fnaspssites tgitsfpesr ftmsvtest
 10261 hlstdllpsa etistgtvmp slseamtsfa ttgvpraisg sgspfsrtes gpgdatlst
 10321 aeslpssstpv pfssstfttt dsstipalhe itsssatpyr vdtsgtess ttegrlvmm
 10381 tltdssqpgt tssspildtr mtesvelgtv tsayqvpsls trlrltdgim ehikipne
 10441 ahrgtirpvk gpqststspas pkglhtggtk rmetttalk tttalktts ratltsvy

FIGURA 9 (página 4 de 6)

10501 ptlgltpln asmqmastip temmittpyv fpdvpettss latslgaets talprhttps
 10561 fnresettas lvsrsgaers pviqtdvss sepdtasawv ihsaetiptv skttppnffk
 10621 eldtvsstat shgadvssai ptnispseld altplvtisg tdtsttfptl tksphetet
 10681 ttwlthpaet sstiprtipn fshesdatp siatspgae ssaipimtv pgaedlvts
 10741 vtssgtdrnm tiptlrlspg epktiaslvt hpeaqtssai ptstispavs rlvtsmvts
 10801 aaktsttnra ltnspgepat tvslvthpaq tsptvpwts iffhsksdtt psmttshga
 10861 sssavpttv stevgvvtp lvtssravis ttipiltlsp gepetpsma tshgeass
 10921 iptptvspgv pgvvtslvts sravtsttip iltfslgepe ttpsmatshg teagsavpt
 10981 lpevgmvtv lvassravts ttlpttlsp gepetpsma tshgaaeasst vptvspevp
 11041 vvtslvtsss gvnstsiptl ilspgelett psmatshgaa assavpttv spgvsgvvt
 11101 lvtssravts ttipiltlss sepetpsma tshgveassa vltvspevpg mvtslvtss
 11161 avtsttiptl tissdepett tslvthseak misaiptlav sptvqglvts lvtssgset
 11221 afsnltvass qpetidswva hpgteassvv ptltvstgep ftnislvthp aessstlpr
 11281 tsrfshseld tmpstvtspe aesssaistt ispgipgvlt slvtssgrdi satfptvpe
 11341 pheseatasw vthpavtstt vprtpnysh sepdttsia tspgaaeatsd fptitvspd
 11401 pdmvtqvts sgttsitip tltlsgepe tttsfityse thtssaiptl pvsplaskm
 11461 tslvissgtd sttfptlte tpyepettai qlihpaetnt mvprtpkfs hksdttlp
 11521 aitspgpeas savsttisp dmsdlvtslv pssgtdtstt fptlsetpye pettawlt
 11581 paetsttvsg tipnfshrgs dtapsmvtsp gvdtrsgvpt ttippsipgv vtsqvtssa
 11641 dtstaipltl pspgepetta ssathpgtqt gftvpirtvp ssepdtmasw vthppqtst
 11701 vsrttsssfh sspdatpvma tsprteassa vlttispgap emvtqits gaatsttvp
 11761 lthspgmpet tallsthprt etsktfpast vfpqvsetta slirpgae stalptqtt
 11821 slftllvtgt srndlspas pgvsaktapl sthpgtetst miptstlslg llettilla
 11881 ssaetstt ltlvspavv glssasittd kpqtvtswn etspsvtsvg ppefsrtvt
 11941 ttmtlipsem ptpktshtge gvspttilrt tmveatnlat tgssptvakt tttfnltlag
 12001 lftplttpgm stlassesvts rtsynhrswi sttssynrry wtpatstpvt stfspgist
 12061 sipsstaatv pfmpftrlnf titnlqyeed mrhpgsrkfn aterelqgll kplfrnssl
 12121 ylysgcrlas lrpekdssat avdaicthrp dpedlgldre rlywelsnlt ngikelgpy
 12181 ldrnslyvng fthrssmptt stpgtstvdv gtsqtpsssp spttagpllm pftlnftit
 12241 lqyeedmrkt gsrkfntmes vlggllkplf kntsvgplys gcrlllrpe kdgaatgvd
 12301 icthrlpks pglreqlyw elsklndie elgpytldr slyvngfthq ssvsttstp
 12361 tstdvdlrtsg tpslsspti maagpllpf tlnftitnlq ygedmghpgs rkfntrerv
 12421 qllgpifkn tsvgplysgc rltslrsekd gaatgvdaic ihhldpkspg lnrerlywe
 12481 sqqlngikl gpytldrnsl yvngfthrt vptsstpgts tvdlgtsgtp fsllspata
 12541 pllvlftrlnf titnlkyeed mhrpgsrkfn ttervlqtl gpmfkntsvg llysgcrlt
 12601 lrsekdaat gvdaicthrl dpkspgvdre qlywelsqlt ngikelgpyt ldrnslyvn
 12661 fthwipvpts stpgtstvd gsgtpsslp pttagpllp ftlnftitnl kyeedmhcp
 12721 srkfntterv lqsllgpmfk ntsgvplysg crlrlrsek dgaatgvdai cthrlpks
 12781 gvdreqlywe lsqllngike lgpytldrns lyvngfthqt sapntstpgt stvdlgtsg
 12841 psslpsptsa gpllpftln ftitnlqye dmhhpgsrkf nttervlqgl lgpmfknts
 12901 gllysgcrlt llrpeknaga tgmdaicsr ldpkspglnr eqlywelsql thgikelgp
 12961 tldrnslyvn gfthrssvap tstdpgtstvd lgtsgtpssl pspttavpli vpftlnfti
 13021 nlqygedmrh pgsrkfntte rvlqgllgpl fknssvgply sgcrllisrls ekdaatgv
 13081 aicthhlnpq spgldreqly wqlsqmtngi kelgpytldr nslyvngfth rssglttst

FIGURA 9 (página 5 de 6)

13141 wtstvdlgts gtpspvpspt ttgpllvpft lnftitnlqy eenmghpgsr kfnitesvl
 13201 gllkplfkst svplysgcr ltlrlpekdg vatrvdaict hrpdpkipgl drqqlywel
 13261 qlthsitelg pytldrdsly vngftqrssv pttstpgtft vqpetsetps slpgptatg
 13321 vllpftlnft itnlqyeedm rrpgrkfnt tervlqgllm plfkntsvss lysgcrltl
 13381 rpekdgaatr vdavcthrpd pkspgldrer lywklsqlth gitelgpytl drhslyvng
 13441 thqssmttr tpdtstmhla tsrtpaslsq pm tasplvl ftinf titnl ryeenmhhp
 13501 srkfntterv lqgllrpvfk ntsgplys crl lrlpk dgaatkvdai ctyrpdpk
 13561 gldreqlywe lsqqlthsite lgytldrds lyvngftqrs svpttsipgt ptvdlgtsg
 13621 pvs kpgpsaa spl lftln ftitnlryee nmqhpgrkf nttervlqgl lrs lfksts
 13681 gplysgcrlt lrlpekdgt a tgvdaict h pdpk sprldr eqlywelsql thnitelgp
 13741 aldndslfvn g fthrssvst t stpgt ptyv lgasktpasi fgpsaashll ilftlnfti
 13801 nlryeenmwp gsrkfntter vlgllrplf kntsvgplys crl lrlpe kdgeatgvd
 13861 icthrpdptg pgldreqlyl elsqqlthsit elgytldrds slyvngfthr ssvpttstg
 13921 vseepftlnf tinnlrymad mgqpgslkfn itdnvmqhl splfqrsslg arytgcrvi
 13981 lrs vnkngae rvdl lctylq plsgpgplik qvfhelsqqt hgitrlgpys ldkd slyln
 14041 yne pgpdepp ttpkpat tfl pplseattam gyhlktltn ftisnlqy sp dm gkgsatf
 14101 stegvlqhl rplf qkssmg pfylgcqlis lrlpekdgaat gvd ttctyhp dpvgp gldi
 14161 qlywelsqlt hgvtqlgfyy ldrds l f ing yapqnl sirg eyqinf hvn wnl snpdpt
 14221 seyitllrdi qdkvttlykg sqlhdtfrfc lvt nltmdsv ltvkalfss nldpslveq
 14281 fldktlnasf hwlgstyqlv dihvtemess vyqptsssst qhfylnftit nlpysqdk
 14341 pg tnyqrnk rniedalnql frnss iksyf sdcqvstfrs v pnrhhtgvd slcnfspl
 14401 rvdrvaiyee flrmtrngtq lqnf tldrss v lvdg yspnr ne p l tgn sdl p fw a vili
 14461 agllgvitcl icgvlvttrr rkkegeeynvq q qcp gyyq sh ldledq

(B) Péptido 1

14394 14410
 nf splar rvdrvaiyee (SEQ ID NO:01)

(C) Péptido 2

14425 14442
 tldrss v lvdg yspnr ne (SEQ ID NO:02)

(D) Péptido 3

14472 14492
cgv lvttrr rkkegeeynvq qq (SEQ ID NO:03)

(E) Región transmembrana:

14452 14475
f w a v i l i g l a g l l g v i t c l i c g v l (SEQ ID NO:14)

(F) Péptido que contiene el péptido de bucle de cisteína:

14367 14398
ksyf sdcqvstfrs v pnrhhtgvd slcnfspl (SEQ ID NO:15)

FIGURA 9 (página 6 de 6)

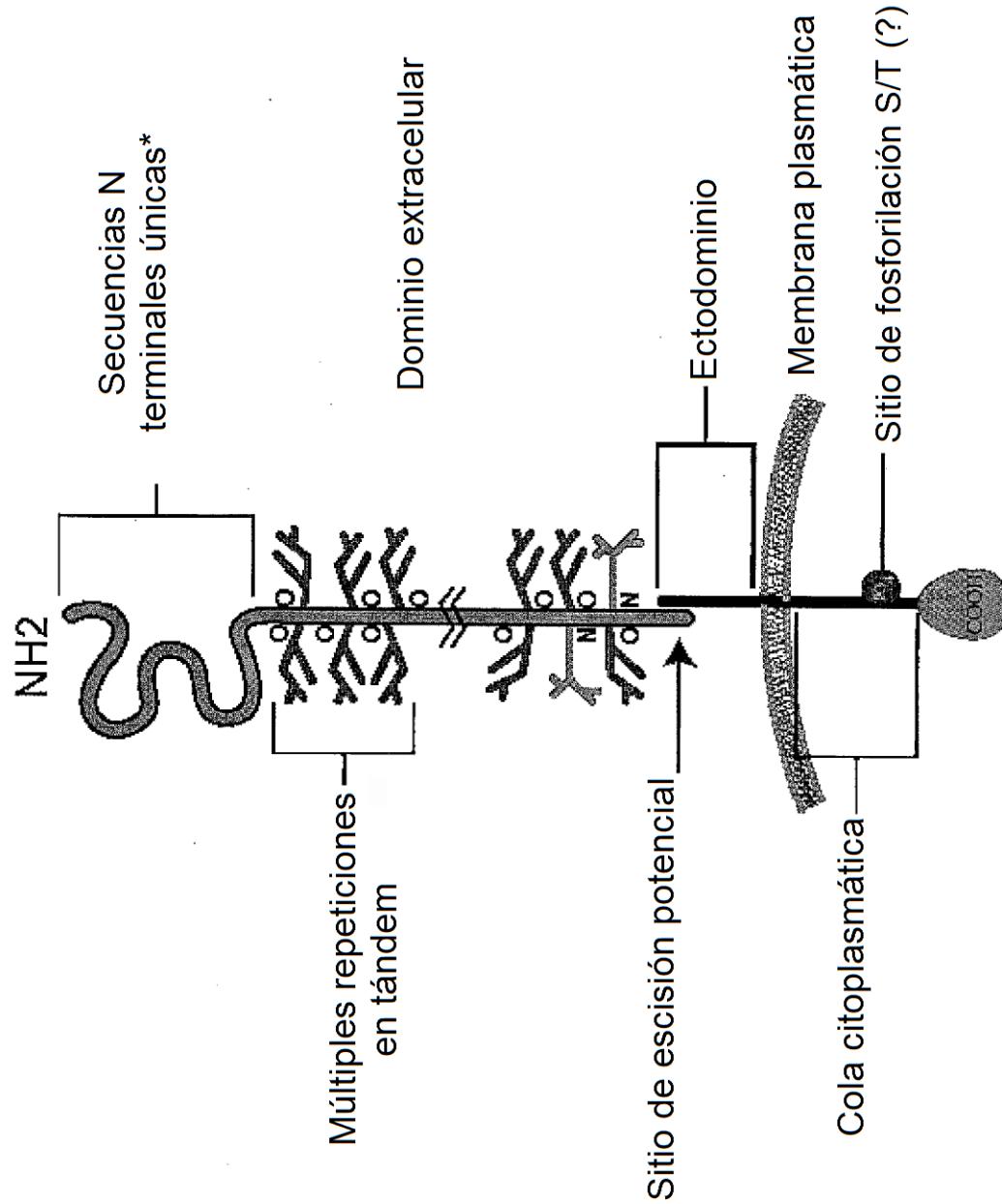


Figura 10

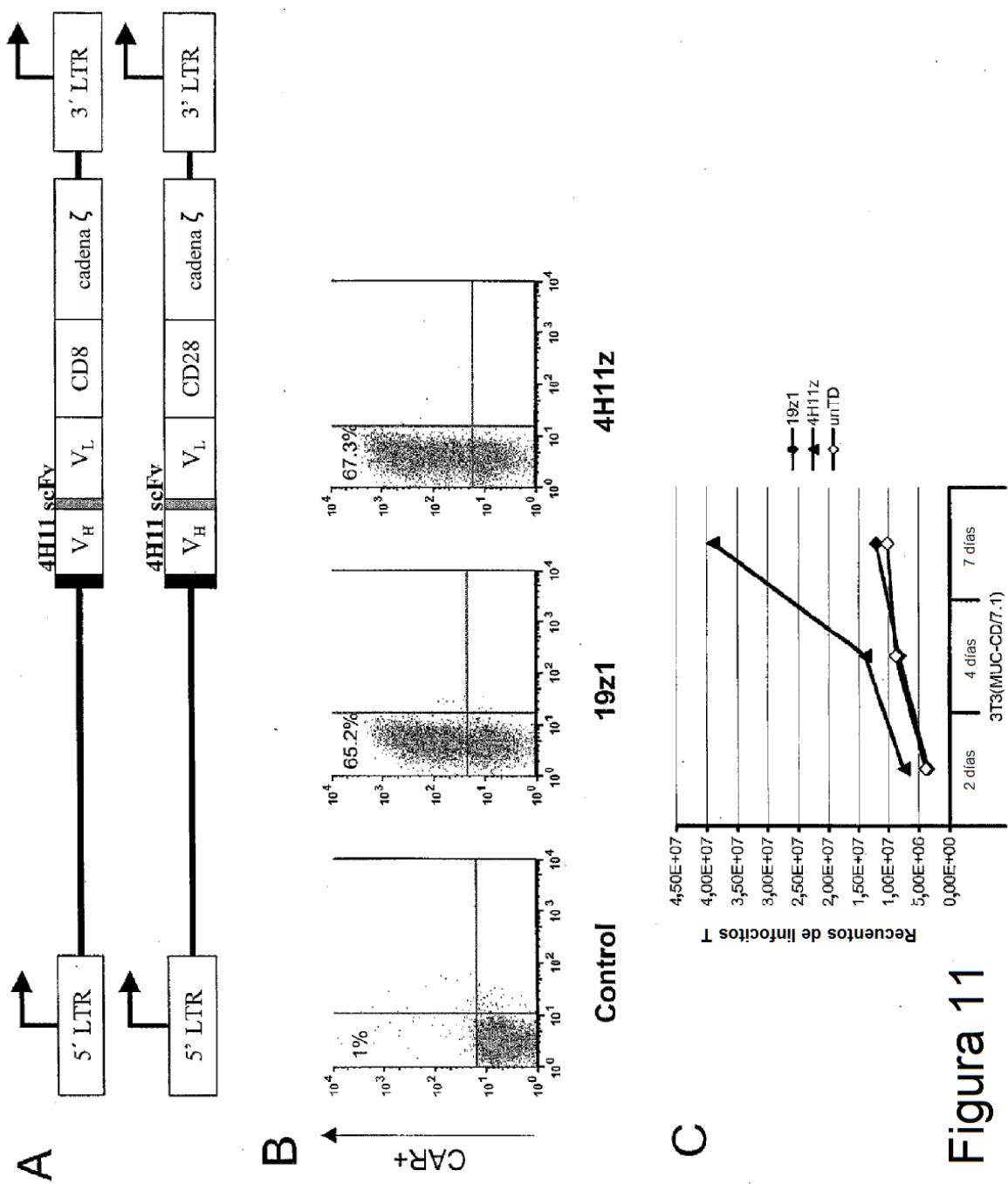


Figura 11

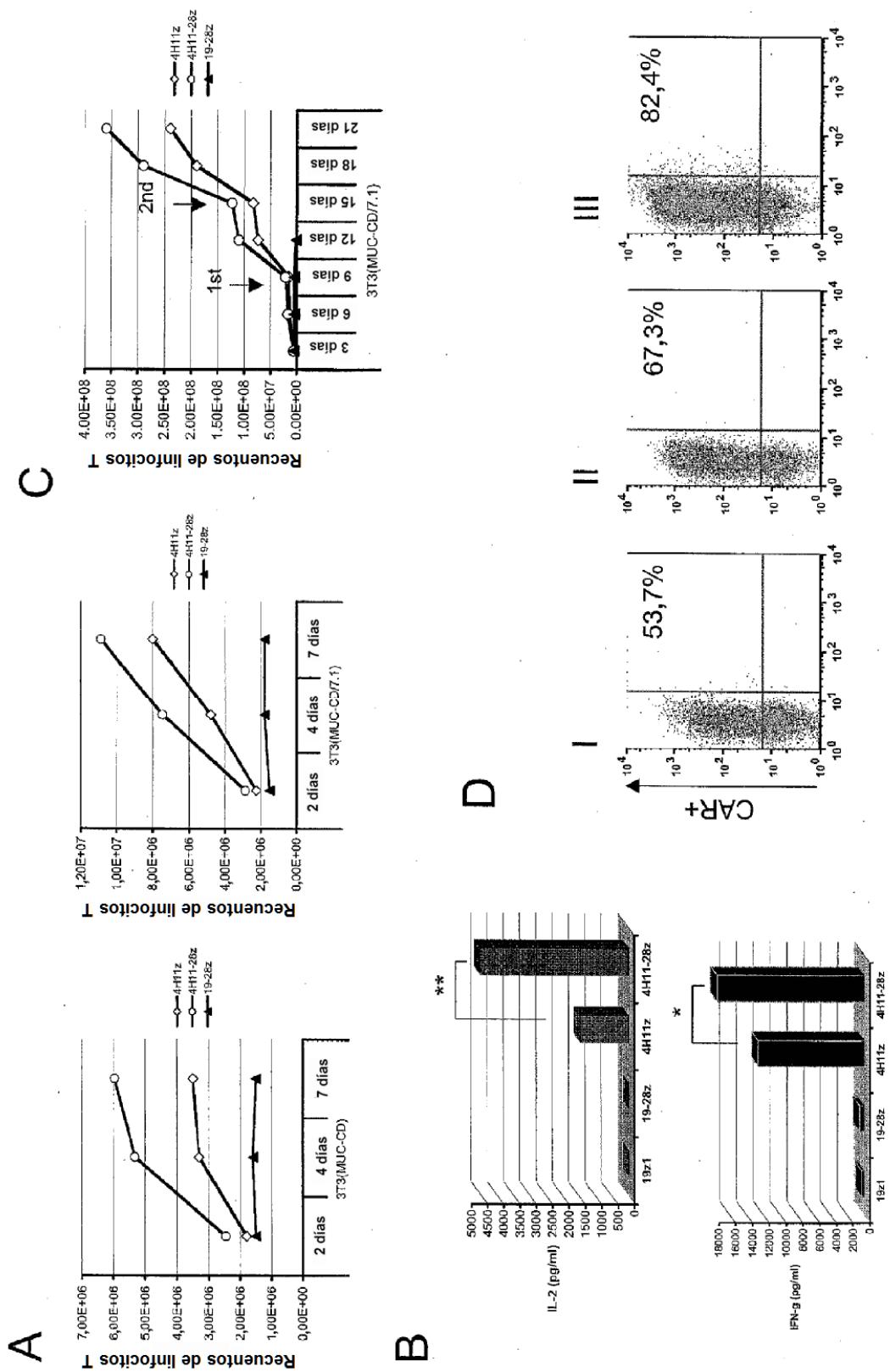


Figura 12

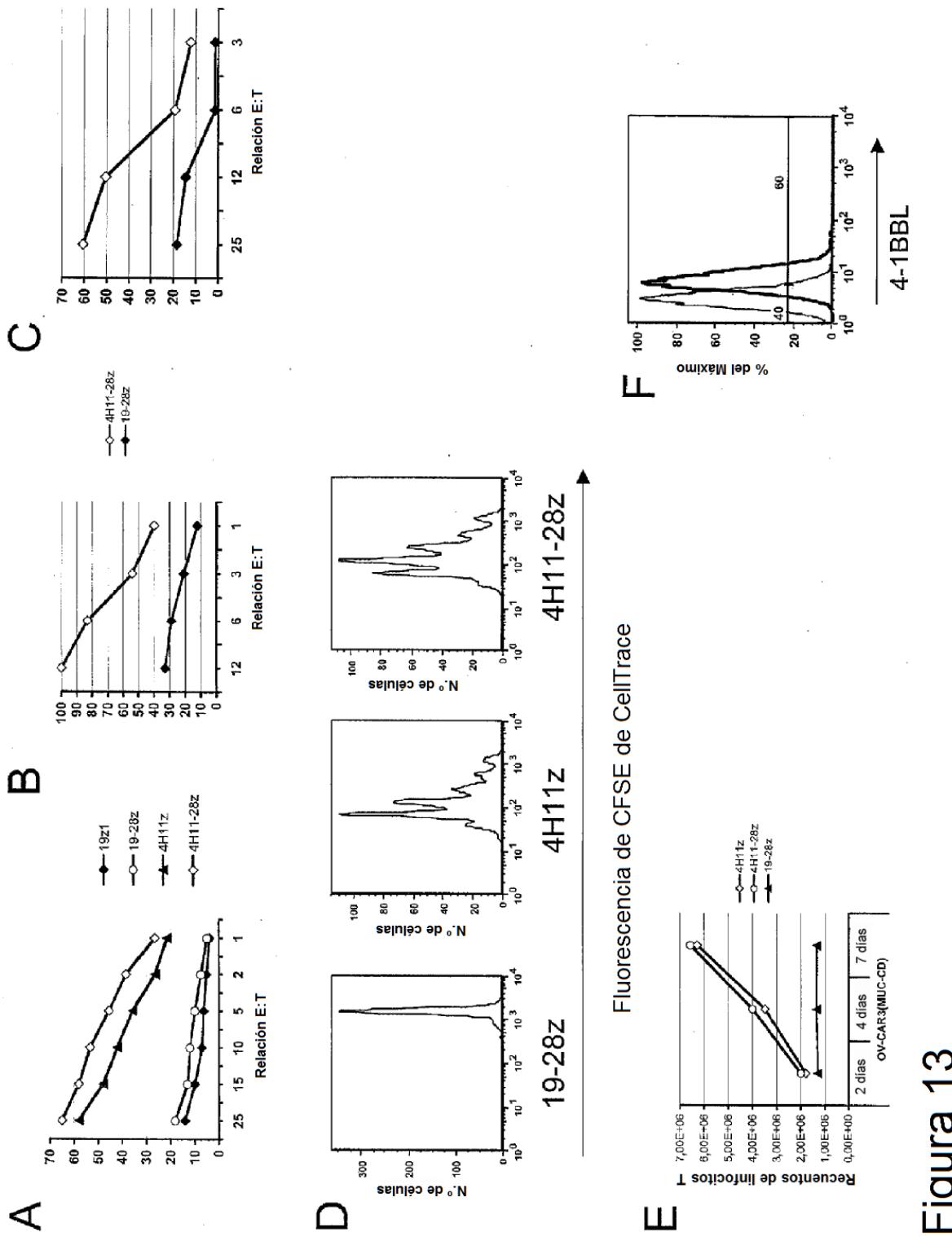


Figura 13

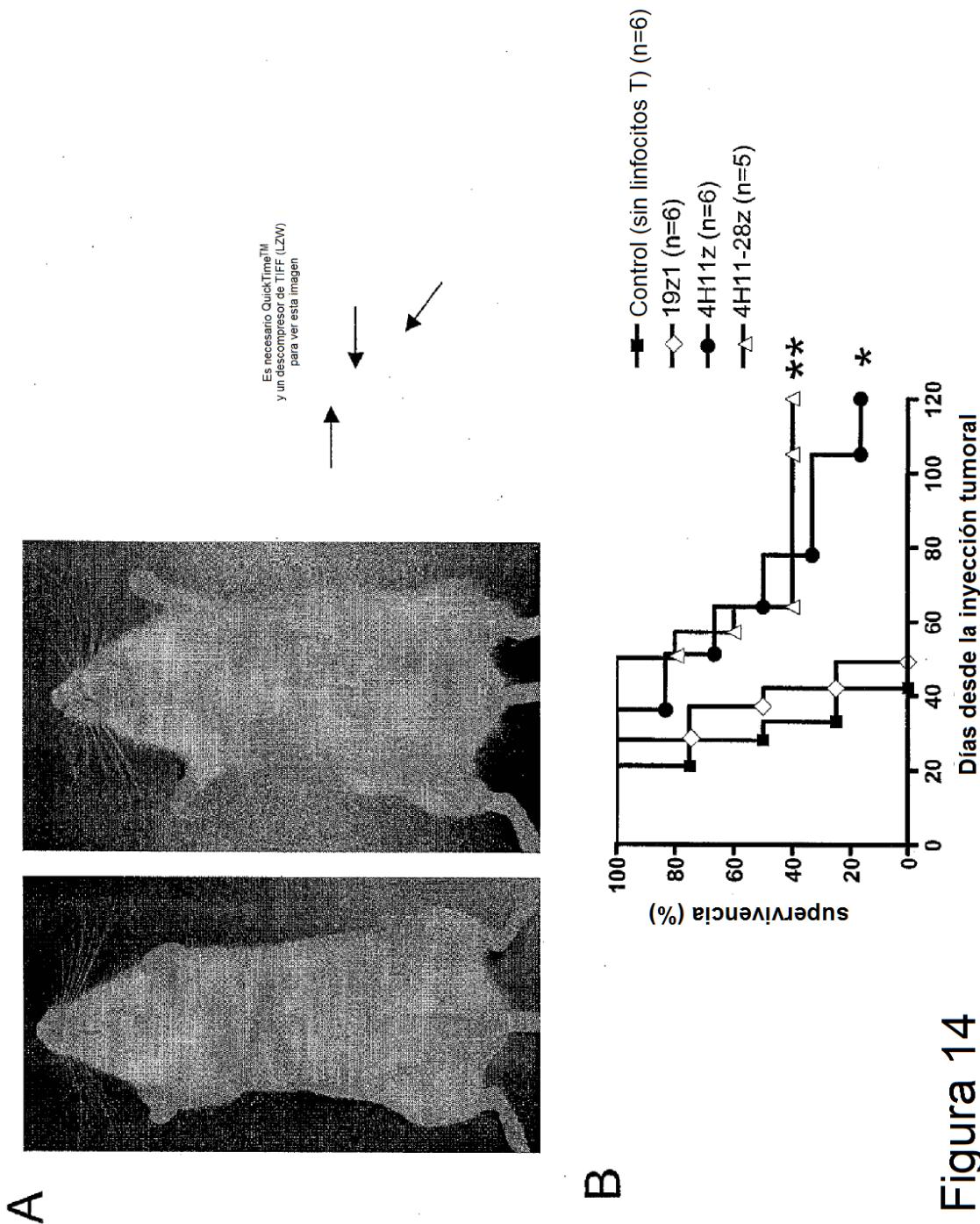


Figura 14

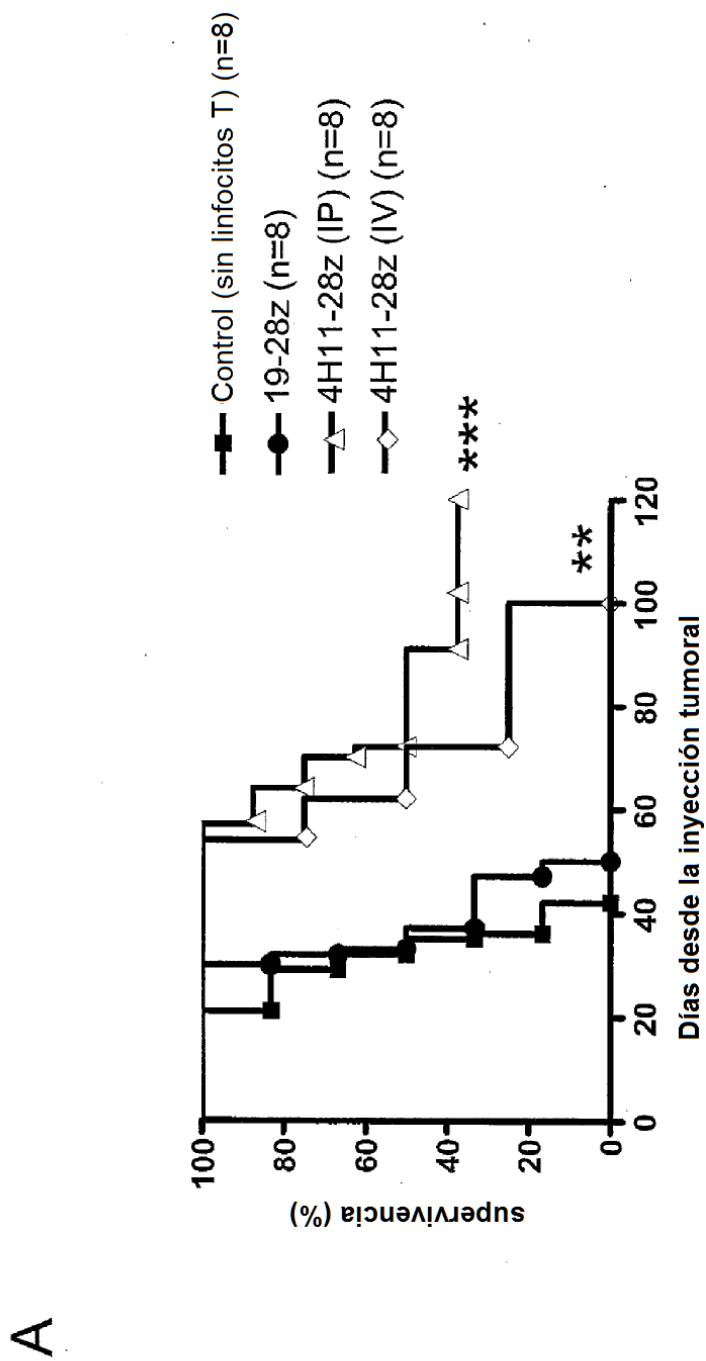
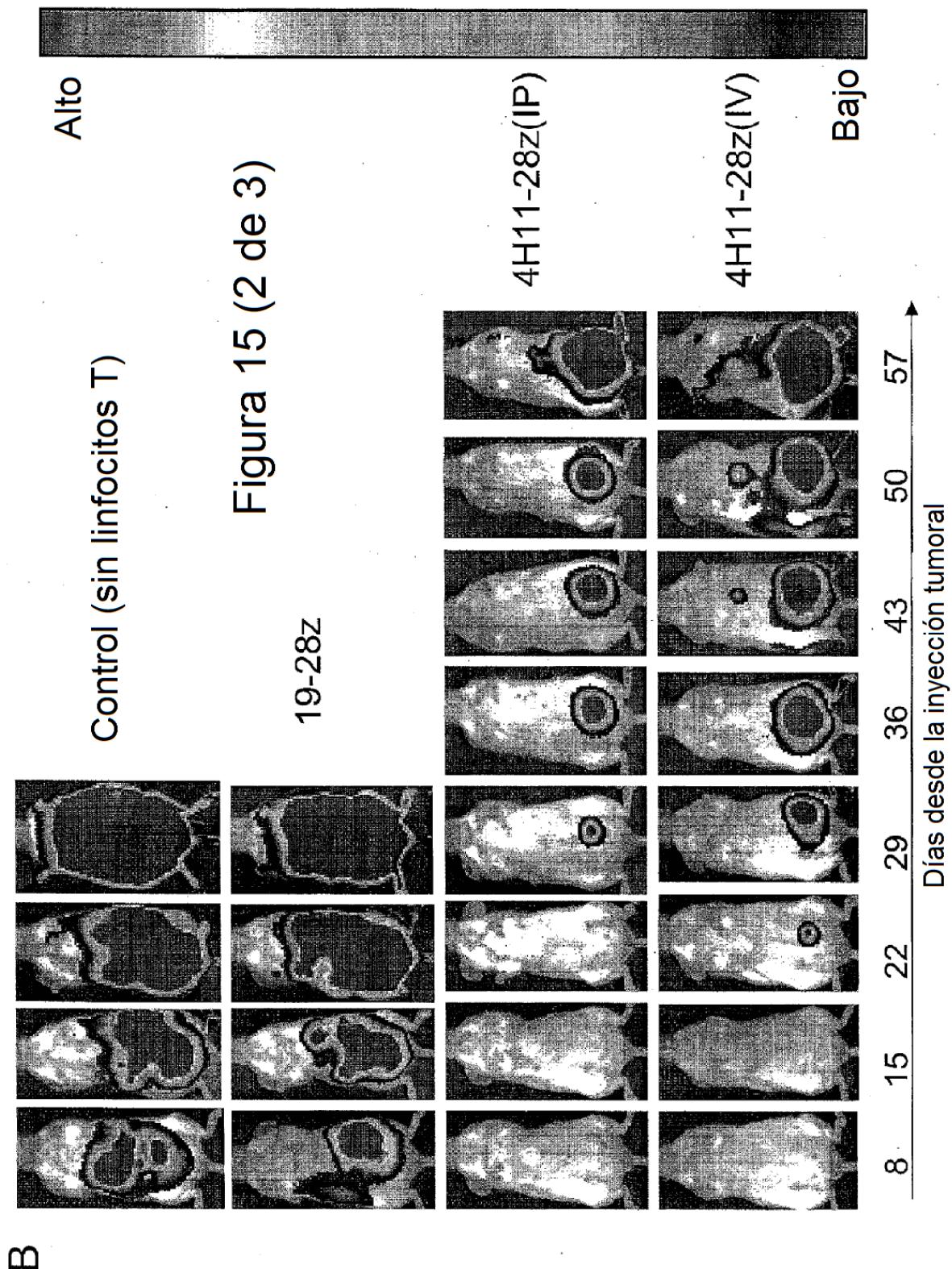


Figura 15 (1 de 3)



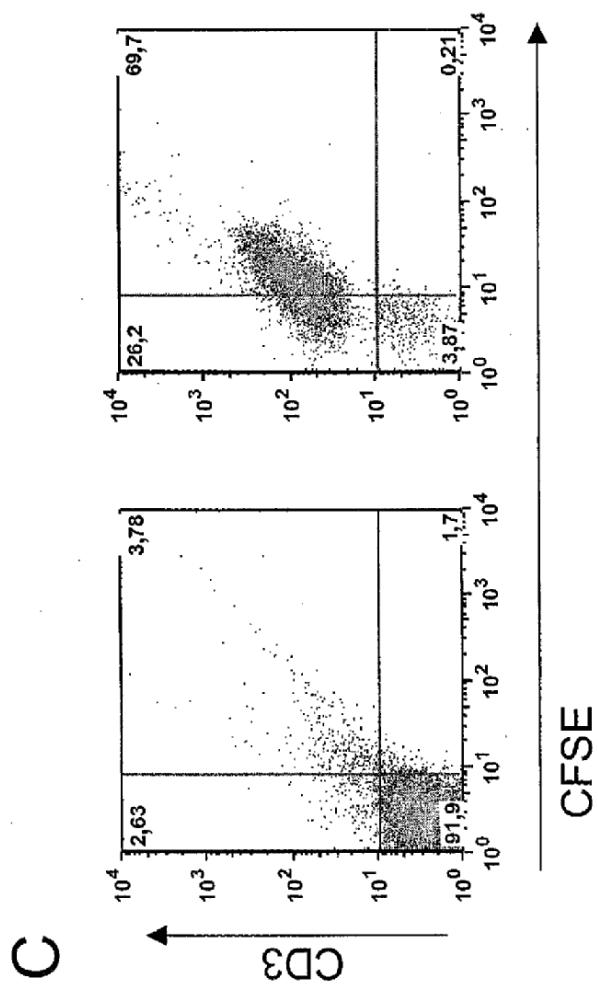


Figura 15 (3 de 3)

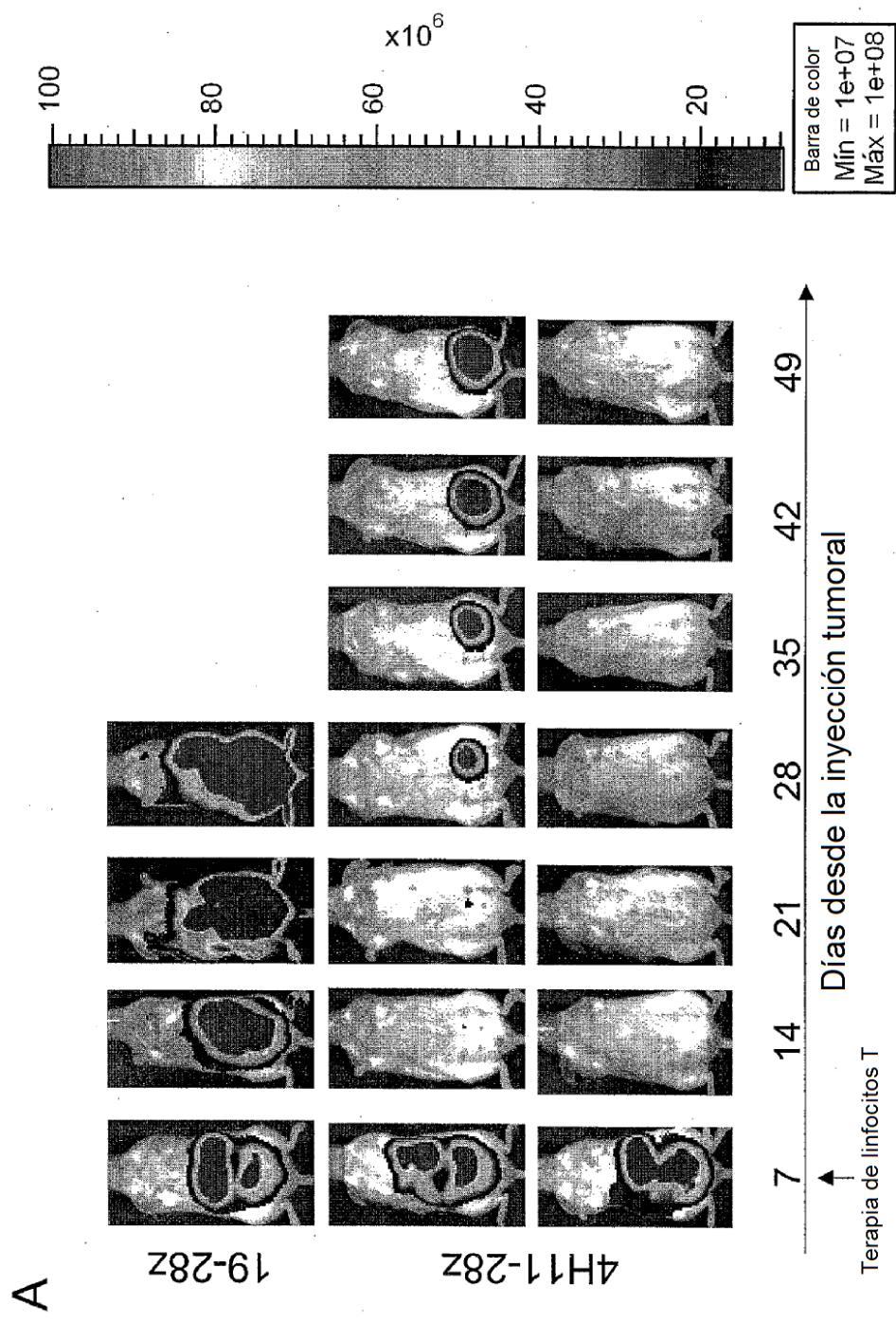


Figura 16 (1 de 2)

B

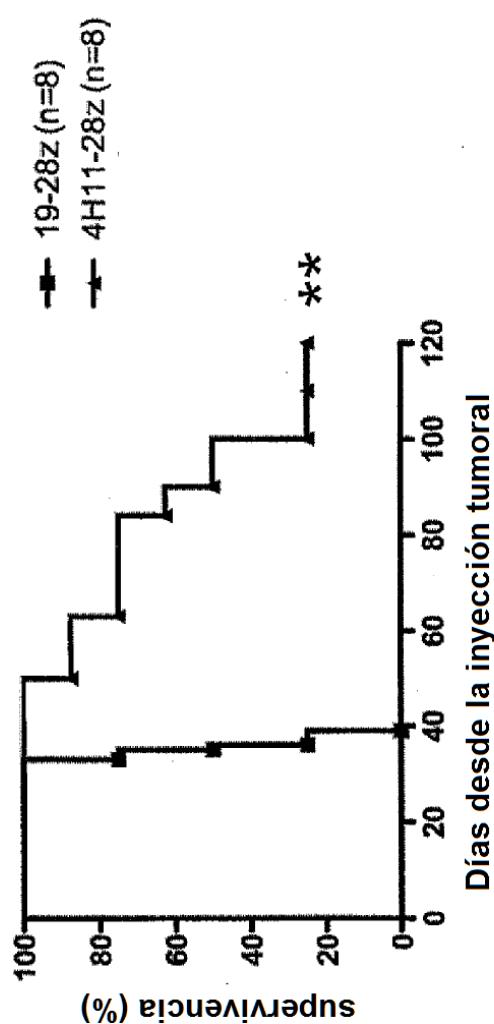


Figura 16 (2 de 2)

Secuencia líder de CD8

ATGGCTC TCCCAGTGAC TGCCCTACTG CTTCCCTAG CGCTTCTCCT GCATGCAGAG

Dominio intracelular de cadena zeta de CD3

AGAGT GAAAGTTCAAGC AGGAGCGCAG AGCCCCCGC GTACCAGCAG GGCCAGAAC AGCTCTATAA
CGAGCTCAAT CTAGGACGAA GAGAGGAGTA CGATGTTTG GACAAGAGAC GTGGCCGGGA CCCTGAGATG
GGGGGAAAGC CGAGAAGGAA GAACCTCTAG GAAGGCCTGT ACAATGAAC GCAGAAAGAT AAGATGGCGG
AGGCCTACAG TGAGATTGGG ATGAAAGGCG AGCCGCCGGAG GGGCAAGGGG CACGATGGCC TTTACCAGGG
TCTCAGTACA GCCACCAAGG ACACCTACGA CGCCCTTCAC ATGCAGGCC
TGCCCCCTCG

Enlazador de serina-glicina (G4S) 3

GGTG GAGGTGGATC AGGTGGAGGT GGATCTGGTGGAGGTGGATC T

Dominio transmembrana de CD8

GCGGCCGCAC CCACCACGAC GCCAGCGCCG CGACCACCAA CCCCAGCGCC CACGATCGCG TCGCAGCCCC
TGTCCCTGCG CCCAGAGGCG TGCCGGCCAG CGGCCGGGGG CGCAGTGCAC ACGAGGGGGC TGGACTTCGC
CTGTGATATCTACATCTGGG CGCCCTTGGC CGGGACTTGT GGGGTCCCTTC TCCTGTCACT GGTTATCACC
CTTTACTGCA ACCAC

Dominios transmembrana + intracelular de CD28 (-TERMINACIÓN)

CAA TTGAAGTTAT GTATCCTCCT CCTTACCTAG ACAATGAGAA GAGCAATGGA ACCATTATCC
ATGTGAAAGG GAAACACCTT TGTCCAAGTC CCCTATTTC CGGACCTCT AAGCCCTTTT GGGTGCTGGT
GGTGGTTGGT GGAGTCCTGG CTTGCTATAG CTTGCTAGTA ACAGTGGCCT TTATTATTTT CTGGGTGAGG
AGTAAGAGGA GCAGGCTCCT

Figura 17

Figura 18 (1 de 5)

2101	TCACCCGAGA	ACGGTGGTGA	AAGTAAAGA	TGCTGAAGAT	CAGTGGGTG	CACGAGTGGG	TTACATCGA	CTGGATCTCA	ACAGGGGTA	GATCCCTTGAG
2201	AGTGGGGCTT	TGGGACCACT	TTCATTCT	ACGACTCTA	GTCACCCAC	GTCGTCACCC	AAATGTGCTT	GACCTAGAT	TGTCGCCATT	CTAGGAACCTC
2301	AGTTTTCGCG	CCGAGAACG	TTCGCAATG	ATGAGCACTT	TAAAGGCTCT	GCTATGTCGC	GCGGTATTAT	CCCGTATTGA	GGCCGCCCCAA	GAGCAACTCG
2401	TGCGGCCGAT	TCGAACTCT	CAGAATGACT	TGGTGGAGTA	CTCACCGTC	ACAGAAGGC	AACTTAAGGA	GGGCTAACT	GGGGCCCGFT	CTCGTTGAGC
2501	GTAACTCGCC	TGATCCTGG	TTGATCGTT	GGAAACGGG	CTGAATGAGA	GGTAAAGCT	GGTAAAGCT	GGCTTACGA	GGCTTACGA	GGCTTACGA
2601	CATTGAGCG	AACCTAAC	TGGGAACT	CCTACCTAG	GGTAAAGCT	GGTAAAGCT	GGTAAAGCT	GGTAAAGCT	GGTAAAGCT	GGTAAAGCT
2701	TGTTAAATG	ACCGCTGAT	TGGTGGGGT	GGGCTGGGT						
2801	GTAGTTATCT	ACACGAGCG	ACCAAAATAC	GACTATTAG	ACCTGGCCA	CTCGACCCA	GGGGCTACCA	GGGGCTACCA	GGGGCTACCA	GGGGCTACCA
2901	CATCAATAGA	TGTGCTGCC	CTCAATATATA	CTCAATATATA	CTTATGATG	TTAATGATAC	TGTCCTATAC	TGTCCTATAC	TGTCCTATAC	TGTCCTATAC
3001	TGTTCAAT	GAGTTAAAT	TAAATTCAC							
3101	CCCTAACTG	TCCACTGAG	GTCAACCCC							
3201	CGGAATTCGA	AGGTGACTCG	CGATCTGGGG							
3301	CAAAACAAAA	AACCAACCGCT	ACCCGGCTG	GTTCGTTGTC	CGGATCAAGA	CGGATCAAGA	CGGATCAAGA	CGGATCAAGA	CGGATCAAGA	CGGATCAAGA
3401	GTTCGTTTT	TGGGGGGCA	TGGTGGCCAC	CAAACAAACG						
3501	CAAAACTGT	CCTCTCTAGT	TAGCCGTAGT	TAGGCCACCA	CTCAAGAAC	TCTGTAGCAC	TCTGTAGCAC	TCTGTAGCAC	TCTGTAGCAC	TCTGTAGCAC
3601	GTTTATGACA	GGAAAGATCAG	ATCGGCTATCA	ATCCGGCTGT	GAAGTCTCTG	AGACATCGTG	GGGGGAAAGG	GGGGGAAAGG	GGGGGAAAGG	GGGGGAAAGG
3701	TGTGTCGCA	GGGGGATCACT								
3801	AGCGAGCTCA	CGCGCTATTC	GGCGTCCCG							
3901	GTAAACCTCA	TGTCCTCTTC	TGCGTTATCC	CCTGTTATCC	CTTGTGCTTC	AACTATTGGC	AACTATTGGC	AACTATTGGC	AACTATTGGC	AACTATTGGC
4001	AAACGGAGCT	ACAAAGAACG	ACGCAATTAGG	GGACTAAAGC	GGGAAAGCGG	GGGAAAGCGG	GGGAAAGCGG	GGGAAAGCGG	GGGAAAGCGG	GGGAAAGCGG
4101	AGCGAGCTCA	GTCAACGCG								
4201	ATGTTGTTG	GAATTTGAG	CGGATAACAA	TTTCACACAG	GAACAGCTA	TTACACTCAA	TTACACTCAA	TTACACTCAA	TTACACTCAA	TTACACTCAA
4301	TACAACAC	CTAAACACTC								

Figura 18 (2 de 5)

		TTAATGAAATC TCAAAGACAG TAATGGCAAA GGAAGGAGTC AACGTGTTGTA TTACGGCAC GACTCGTTCG GTCAACGTTA GACAGTCCTA GTAAAGGGT
4401		TTATGCCAGT CATAATTAATT ACTAGTCATP TAGTTGATTI TTATTTTGA CATAATCATG TGATGAAAG ACCCCACTTG TAGTTTGGC AAGCTAGTCCT
		AATACTGGTCA GTATAATTAA TGATCAAGTA ATCAACTAA AATAAAACT GTATATGTCAC ACTTACATTC TGGGGGGAC ATCCRAACCG TTGGATCGAA
4501		AAGTAACGCC ATTGTCAGAATC TTAAACGTC TGTCTTGGG TGTCTTGGGTT ATGTTGAAATC TTGAACTGAA AGATGATGAA CACGATGATAT ATGGGCCRAA
		TTATGCCG TAAACGTC CTCATGTTA ATGTTGAA TCTCTATCTT CTCATGTTA GTCAAGTCA CTCATGTTA GTCTGACTCT TGTGACTCTA AGTGTGACTTA
4601		CAGGATATTCTT CTTGTTGCCC CGGCTCTAGGG CCAAGAACAGT TGAAAGAACAGT GGTTTGTCTT ATAGACACCA TTGCTGAAAGGAA
		GTCCTATAGA CACCATTGCT CAAGGACGGG GCGGAGTCCC GGTCTTGTGAC ACTTATACCC ATCAGATGTTT TCCAGGGGTC CCAGAGGACCC
4701		TGCCCGGCT CAGGGCCAG AACAGATGGT CCCAGATGTC GGTCTAGGCCT CAGGAGTCCC AGTGTCTGG TAGTCTACAA AGGTCCCACG GGTTCTGG
		ACGGGGCGA GTCCCCGGTTC TTGTCACCA GGGGTCTACG CGAGTCGCGG AGTCGTCAA CGGCTTGTCTG GCCTGTTATGC TCCCCGAGT CAAATAAAGA
4801		TGAATGACC CTGTGCCCTTA TTGAACTTA CCAATCAATTG CGCTTCTCAGC TTCTGTTGCG GCGAAAGGGC AGAGCAAGGG CGCGAATATCG AGGGGCTCGA
		ACTTACTGG GACACGGGAT AAACCTGATTI GGTTAGTCAA CTGGTACCTTCTG TGTTATCCCAT AAACCCCTCTT GTTATTCTCTC
4901		CCTCACTCGG GGCGCCAGTC CTCGGATTTGA CTGAGTCGCC CGGTACCCCCC ATGGTCTAGT CCAGTGTGCTA CGCTACCTG
		GGAGTAGGCC CGCGGGTCAG GGGCTTAACCT GACTCAGGCC GCCCATGGGC ACATAGTTGTT TTGGGAGGAA CGTCTACAGA CAGAGGACACA
5001		TCCTTGGGGC GGTCTCCCTCTT GAGCTGATGA CTCACATCAAT GAGCTGTTGCA TTACAGCTTCA GGTGGGCTGG ACCTCTGGC
		AGGAACCTTC CCAGAGGGAA CTCACATACCT GATGGGGACT CGGCCCTTCAAGA AAGTAAACCC CGGAGCAGSCTC TGCCCTGGGG
5101		GACCCACCCAGC CGGGGGTTAA GCTGGCCAGC AACTTATCTG TGTCGTGTCG ATTGTCTAGT GTCATATGACT GATTTATGSC
		CTGGGTGGTG GCCTCCATT CGACGGGTGCG TTGAATAGAC ACAGACAGGC TAACAGATCA CAGATACTGA CTAATAATAGC CGGACGCACTC
5201		GCTAACTAGC TCTGTATCTG GGGGACCCGGT GGTGGAACTG ACGAGTTGG AACACCCGGC CGCAACCTCTG GGAGAGCTTC
		CGATGTATGG AGACATAGAC CGGCTGGGCA CCACCTGTAC TGCTCAAGCC TTGTGGGGCG CGCTTGGGACG
5301		TTGTGGCCCG CTGGCTGAGTC CTAATAATCC GATCGTTTGG GACTCTTGG TGCACCCCCG TTAGGGAGGCT GATATGTTG
		AAACACGGG CTGGACTTCAG GATTTGAGGG CTGAAATTC CTGAGAACCC AGCTGGGGGG AAATCTCTCC CTATAACCA AGACACATCT
5401		TAATAACGTG TCGTAAATTG TGCTGTTGGT TTGTGGACCA AGCGCTGGC CGGGTCTTGTCTG CTGCTGCAAGC
		ATTGTGTCGA GGGGGAGGEC AGACATAAA AGCAAGGCC AACCCGGT TCGGGAGTCG GCGGAGAAGCA
5501		TCTGACTTG TTTCGTGATT TGTCGAAATA TATGGGGCGG GGCTAGTACTG TTACCACTTC
		AGACTGACAC AAAGACATAA ACAGACTTT ATACCCGGC CGGATCTGAC AATGGTGGAGG
5601		ATCGTCACAA CACAGTCGGT AGATGTCAG AAGAGACGTT GGTTACCTT CTGCTCTGCA
		TAGCGACGTG TTGTCAGCTA TCTACAGTC TTCTCGCAA CCCATGCAA GACGAGACTG
		CTTITACCG AGACCTCTATC ACCAGGTTA AGATCAAGT CTTITCTACCT GGGCCGGCATG
5701		GGAAATGGC TCTGGAGTAG CTTGTCACCA TCTAGTCTCA CAAAGAGTCA CGGGCGCTAC
		CTTGGCTTTT GACCCCCCTTC CTCGGGTCA CACCTTAAGC CTGGCTCTG
5801		GAACCGAAA CTGGGGGGAG CGGAGCAGT GGAGGAAACCTA GTGGGATTCAG
		CGTTGACCC CGCCCTCCTATC CCAGCCCTCA CTCCCTCTCT AGGGCGCCCC
5901		GCAAGTGGG GGGGGAGT GAGGGAAATA GGTGGGGAGT TATAGGATCTT ATATGGGCTT
		TATACCGGTTA TACCTGAAAGA TCCGGGGGGG

Figura 18 (3 de 5)

Fig. 18 (4 de 5)

7001	GTCCCTGATC GCTTCAAGG CAGTGGAGATT TCACTCTAAC CATCAGCGT GTGCCAGGTGC AGTTTATTC TGCCAGGCAAT CAGGGACTAG CGAACTGTC GTCACCTAGA CCCTGCTAA AGTGAGATG GTCAGCTCA	VL	Dominio transmembrana de CD8
7101	CTTATAATCT ACTCACGTTG GGTCCCTGGGA CCAAGGTGG GATCAAACGG GAATTATAGA TGAATGGCAAG CCAGGACCTT GGTTGACCT CTAGTTGCGC	VI	Dominio transmembrana de CD8
7201	CACGATCGCG TCGAGCCCC TGTCCTGGG CCCAGGGG TGCCGGCG GTGCTAGCGC AGCCCTGGG ACAGGACGCG GGGTCTCGC	V	Dominio transmembrana de CD8
7301	TACATCTGGG CGCCCTTGGC CGGGACTTTGGT GGGGACTTCTTC TCCTGTCACT GTTATCACC ATGAGACCC CGGGAAACCC GGCCTTAACA CCCAGGAG AGGACAGTGA CCAATAGTGG	IV	Dominio intracelular de cadena zeta de CD3
7401	AGCCCGCGC GTACCAAGCG AGCTCTATAA CGAGCTCAAT CTAGGACGA TCGGGGGGG CATTGTCGTC CGGTCTTGG CTCGATGATT GTCGAGTTA GATCCCTGATT	III	Dominio intracelular de cadena zeta de CD3
7501	CCCTGAGATG GGGGAAAGC CGAGAGGAA GAACCCCTACG GGGACTCTAC CCCCTTTCG GCTCTTCCTT CTGGGGAGTC	II	Dominio intracelular de cadena zeta de CD3
7601	ATGAGGGG AGGGGGGG CACGATGGG TTTACCAAGG TACCTTCGGC TCGGCGCC GTCGCTACGG AAATGGCGCC	I	Dominio intracelular de cadena zeta de CD3 XbaI
7701	TGCCCTCTCG CTAACAGGCCA CTCGAG ACGGGGAGC GATTTGGCGT GAGCTC		

Figura 18 (5 de 5)

BamHI			
1	GGATCCGGAT TAGTCCAAATT TGTTAAGAC AGGATATCG TGGTCCAGGC TCTAGTTTG ACTCACAAAT ATCACAGCT GAGGCCATA GAGTAGGAC		
101	CCTAGGCCAA ATCAGGTTAA ACAATTCTG TCCATAGTC AGCAGCTCCG AGATCAAAC TGAGTGTGTTA TAGTGTGCTG CTCAGTGTG		
101	CATAGTAAA ATAALAGATT TTATTAAGTC TCCAGAAAA GGAGGAAATG AAAGACCCAA CCTGAGTAA GCTGAGTAA CGCCATTATG		
201	GTATCATT TATTCATT AAAATACAA TAAATAGTC AGGTTTTT CCCCCCTAC TTGGGGGGT GGACATCAA ACCGATGCTT CGGATGAAAC		
201	CAAGCCATGG AAAATACAA TAACTGAAAT AGGAGGTT AGATGAGGT CAGAACAGA TGGAACAGT CAAAGGGG GAAATGGG		
201	GTTCCTTACCT TTTCATGTA TTGACTCTTA TCTCTCTCAG TGCTAGTCCA GTCTGTGTT ACCTTGCGA CTTTACCCG GTTGTGCTTA TAGACACAT		
301	AGCGAATCTT GCCCCGGCTC AGGGCCAGA AGGAGGAA TGGGCAAATAGA AGGATATCTG TGGTAAGCG TCTCGGCC GGTCTAGGGC		
301	TCGTCAAGGA CGGGGGGAG TCCCGGTCT TGTCTACCT GTGCACTTAT ACCCGTTG TCCPATAGAC ACCATCGTC AAGGAGGGG CGGAGTCG		
401	CAAGACAGA TGGTCCCGAG ATGGGGTCCA GGCCTCAGCA GTTCTAGAG AACCCTAGA TGTTCTAGG GTGCCCAAG GACCTGAAAT GACCTG		
401	GTTCCTGCTC ACCAGGGTC TAGGCCAGT CGGGAGCTGT CAAAGATCTC TTGTGTGTT ACAAAGTCC CACGGGGTT CTTGAGTTA CTGGAGAC		
501	CTTATTGAA CTAACCAATC AGTTCGGTTC TCGGCTCTGT TCGGCTCTT CTGCTCCCG AGCTCAATAA AAGGCCAC AACCCCTCAC TCGGGGCGCC		
501	GAATAAATCTT GATTTGTTAG TCAAGGAAAG AGCGAGAGCA AGGCGGAA GACGAGGGC TCAAGGAAAG AGCGAGAGCA AGGCGGCG		
601	AGTCCTCCGA TTGACTGAGT CGCCGGGAGT CCAATACCCG TCTGGAGCT GCACTCCAGCT TTGGGGCTTG CTGTTGCTG		
601	TCAGGAGGT AACGAGCTCA GGGGGCCAT GGGGACATAG GTTATTTGGG GTATCAAAAT GTATCAAAAT TAATTTGGTT TTATTCCTA AGTATGGCC		
701	CTCTGAGTGA TTGACTACC GTCAAGGGGG GTCTTCACA CATGCCAGCAT GTACGCGTAA CATACTTA ATTAAACAA AAAGAAATG TCAATAATG		
701	GAGACTCACT AACGATGGG CAGTCGCCG CAGAAAGTGT AAATTAACAT GGATGATTC AAATTAACAT GGATGATTC TAATTTTC		
801	ATAGTACTTA AAGTACATT GGCTCTCTG TTGTCTTGTAA CTCATAAGT CTGCTGTTA AGTGTGTTA GAAATGTTCA TAATTTAG ATAGTACTC		
801	TATCAGTAAAT TTGAGTAA CCGGAGAAC TTAAATTGTA CTCATAAGT CTGCTGTTA AGTGTGTTA GAAATTTAG ATTAAATTC TATCAGAG		
901	CTACTTTTC TTTCATTTT TTGTCCTCTC TGTCCTCCAT TTGTGTGTT TGTTGTGTT TTGTGTGTT TTGTGTGTT TTGTGTGTT		
901	GTATGAAAG AAAATAAAATG AAACAGGAG AGAGAGGTA AACACAAACAA ACACAAACAA AACAAACAA CAACACACAA ACCAAATTA		
1001	ATCCCTAACAT ATAGTCAG CTAGACTT AGTGTGTTA TGCACTGAA TTACCCAGGG TGACCTGGAA TTACCCAGGG ACTGAGACT		
1001	TAGGATGTA TATGAGTC GATGCTGATAA TGCACTGAA TTACCCAGGG ACTGAGACTC CTCACCCAT CGCGGACAA AGTGTGAGTC		
1101	ATTACAGGTA TGAGCTATCA TTTCATGTTAT ATTCATGTTAT TGATGTTGTT ATGTGTGTT GTGTGTGTT GTGTGTGTT		
1101	TAATGTCAT ACTGATGTT AAAACCTAA TAATTAACAA ACTTAACAA TACAGACACA CACACTAACAA CACAGACACA CACAGACACA		
1201	ATGGGTGTGT GTGAGTGTGT GTATGTATGT GTGAGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT		
1201	TACCCACACA CACTACATA CACACACACT CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA TACGACACA		
1301	GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT		
1301	CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA TACGACACA		
1401	TTTTGAGAC AGAGCTTTC ACTTAGCTTG GCACTCACTG GCGCTCGTT TACAAACGTG TGACTGGAA AACCTGGG TGACCCACT TAATGCGCTT		
1501	AAAGACTCTG TCTAGAAAG TGATGAAAC CTCAGTGTGAC CGGGAGAAA ATGGTGCAGC ACTGACCCCTT TTGGGACCGC AAATGGGTTGA ATTAGGGAA		
1501	CGAGGACATC CCCTTTCGG CAGCTGGGT AAATGGAAAG AGGCCGGCAC TTATGCGCA CGATGGCCCT TCCCAACAGT TGCGCAGCT GATGGCGTA		
1601	TGCGTATTTT TTGCGTATTT TTGCGTATTT TTGCGTATTT TTGCGTATTT TTGCGTATTT TTGCGTATTT TTGCGTATTT TTGCGTATTT TTGCGTATTT		
1601	ACGGCATAAA AGGGAAATG GTGACACGC CAAAGGGT GCGTATACCC CTCAGTGTGCG CTCAGTGTGCG CTCAGTGTGCG CTCAGTGTGCG		
1701	ACACCCGCCA ACAGCCGGCT ACGGCCCTG ACGGCCCTG ACGGCCCTG ACGGCCCTG ACGGCCCTG ACGGCCCTG ACGGCCCTG		
1701	TGGGGGGGGT TGGGGGGGGT TGGGGGGGGT TGGGGGGGGT TGGGGGGGGT TGGGGGGGGT TGGGGGGGGT TGGGGGGGGT TGGGGGGGGT		
1801	AGGTGTTTCAC CTCATCAC		
1801	TCCAAAGTGT GCGAGTGTGG CTTTGGCGGC TGGAGTGTGG CAAACGGGGG ATGGCGAAAG GCGCTCGTGA TACGCTTATT TTATAGGT		
1901	TCTGGTGGCA CTTTCGGGG AAATGGCGC TTACACAGCG CCGTGGGGAT AAACAAATAA ATGAGTTAT GTAGTTAT CTCAGACAA TGATGGACAA		
1901	AGTCCACCGT GAAAAGCCCC TTACACAGCG CCGTGGGGAT AAACAAATAA ATGAGTTAT GTAGTTAT CTCAGACAA TGATGGACAA		
2001	ATATGCTTCA TATATAACT TTTCCTCTC CTCACATTC AGGTGTAAGT TATATAACT TTTCCTCTC CTCACATTC AGGTGTAAGT		

Figura 19 (1 de 6)

2101 TCACCCAGAA ACCGTTGGTGA AAGTAAGAAGA TGTCTGAAGAT CAGTGGGGT CAGGAGTGGG TTACATCGAA CTGGATCTCA ACGCGGTTAA GATCCTTGAG
 AGTGGGTCTT TCGGACCRCT TICATTTCCTT ACCACTCTTA GTCAACCCAC GTGCTCACCC AATGGTCTT GTAAAGCTT AATGGTCTT GACCTGAACTTC
 2201 AGTTTCGCC CGCGAAAGACG TTTCCTAAATG ATGAGCCTT TTAAAGTCTT GCTATGTTCT GCGGTTATT CCCTTATGAA CGCGGGCAA GAGGCAACTCG
 TCAAAGCGG GCTCTCTGGC AAAAGTTAC TACTCTGAA AATTCAGAA CGATACACCG CGCCATATAA GGGCATTAACCT GCGGCCGGTT CTTCGTTGAGC
 2301 GTCGGCGCAT ACACATTCTT CAGAATGACT TGGTGTGAGA CTCACCAAGTC ACAGAAAAGC ATCTTACGGA TGGCATGACA GTTGGAGAAT TATGGATGTC
 CAGGGCGCTA TGTGTTAGAAGA GTCTTACTGA ACCAACCTAT GAGTGGTCTAG TGTCTTTCG TAGATGCTT ACCTCTGT CATTCTCTTA ATAGCTCACG
 TGCCATAACC ATGAGTGTATA ACACGTGGC CAACTTCTT CTCACAAACGA TCGAGGACC CGAGGAGAT TGCACAACTT TGCACAACTT GGGGGATCAT
 ACGGTATGG TACTCTCAT TGTGACGCG TGTGATGAA GAGCTTGTG AGCTCTCTGG CTCCTCTGAT TGGCGAAAAGA CGCTCTGTAA CCCCCCTAGTA
 2501 GTAACTCGGC TGTAGCTGTT GCGAACGGAG CTCGATGAGC CGTAACTCAA CGACAGGAGC TGTGATGAA GAGCTTGTG AGCTCTGTAA ACGGCAACAA
 CATTGAGGGG AACTAGCAAC CCTTGGGCTC GACTTACTTC GCTATGGTTT GCTGCTCGCA CTGGGGTCTT AGCTGGTCTT AGCTGGTCTT TGCAGCGGTT
 AACTATTAAC TGGCGGAACTA CTTACTCTAG CTTCCCGGCA ACAAATTAATA GACTGGATGG AGGGGGTAAAG AGGGGGTAAAG AGGGGGTAAAG
 TTGATAATG ACGGCTGTGAT GAGTGGATC GAGGGGGCTT TGTAAATTAT CTACCTTAC TCCGGCTT TCCGGCTT TCAACGCTT GGTGGAGAGC
 TCCGGCTGGC TGGTTATGG CTGATAAATC TGGAGCCGGT GAGGGGGT GAGGGGGT CTCGGGGTAT CATTGAGCA CTGGGGCCAG ATGGTAAGCC
 AGGGCGACCG ACCAAATAAC GACTTATAG ACCTCGGCCA CTGGCACCCA GAGGGGGCTT AGCTGGTCTT GAGCTGGTCTT GAGCTGGTCTT
 GTAGTTATCT ACCATGGATG ACTATGGATG AACGAATAATAG AGAGATGCTG CTCCTCTGAT TAACTGTGG CTCCTCTGAT ATTGGCTGAGC
 CATCAATAGA TGTGCTGCC CTCAGTCTGGT TGTACTAC TGTGTTATC TTGAGTGAAGA CTCATCAC CAGTCTTCTT GATATCTCA TGCACAAAT
 ACCAGTTTA CTCATATATA CTTAGATGAT ATTAAACT TCAATTAA TTAAAGGA CTCATAGTCA TGTAGTGAAGA GAGCTAACCT CTCATAGTCA
 TGGTCAAT CAGTCTAAC TAAATTGAA AGTAAATAAT AATTTTCTC AGTAACTT CTCATAGTCA TGTAGTGAAGA CTCATAGTCA TGTAGTGA
 CCCTTAAGCT GGTGTTTCTG TCCACTGAGC GTGAGACCCC GTAGAAAGA TCAAGGATC TCTCTGAGAT CCCTTCTGTT TGCCTGTAAT CTGCTGCTG
 GGGATATGCA CTCAAAGAGCA AGTGTGACTG CAGTCTGGGG CATTGTTCTAG AGTACCTCTAG AAGAACTCTA GGAAAGAAAG AGGGGATTA
 CAAACAAAAA ACCAACCGCT ACCAGGGGT GTTGTGTCG CGGAGTCAAGA GCTACCAACT CTTTTCGCA AGGTAACTG CTTGAACTG
 GTTGTGTTT TGTGTTGGCA TGGTGCAC CAAACAAACG GCTTGTGTCG TGTGTTGGCA
 2901 CAAATACTGT CCTCTCTAGT TAGCCGTAGT TAGCCACCA CTTGAGAAC TCTGTAGCAC CGCTCTACATA CGCTCTACATA CCCTCCTGTT
 GTTATGACA GCAAGATCAC ATCGGACATCA ATCGGACATCA TGTGTTGGT AGTACCTGTT AGTACCTGTT AGTACCTGTT AGTACCTGTT
 3001 TGCTGCCAGT CGCGTATAGT CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC
 AGCGGGTCA CGCGTATAC CGACGAGATG CGCCAAACTGT AGTCTGCTCA TCAATGGCTA TCAATGGCTA TCAATGGCT
 CAGCCCGACT TGGAGCGAAC GACCTACCC GAACTGAGAT ACCTAGAGC TGTGCTGCA GAAAGGCGCA CGCTTCCGCA AGGAGAAAG
 GTGCGGTGCA ACTCTCGTTG CTGGATGTCG TGTGACTCTA TGTGATGCTC ACTCGTAATCT CTTTGGGGT GCGGAGGGT
 3101 ATCGGTAAAG CGCGAGGTCA GCGTCTTCA GGGAGTCTCA GGGGGAAAGC CTTGTTCTC CTTGTTCTC
 TAGGCCATT CGCGTCTTC CCGCTTCTGC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC
 3201 CAAATCTGT CCTCTCTAGT TAGCCGTAGT TAGCCACCA CTTGAGAAC TCTGTAGCAC CGCTCTACATA CCCTCCTGTT
 GTTATGACA GCAAGATCAC ATCGGACATCA ATCGGACATCA TGTGTTGGT AGTACCTGTT AGTACCTGTT AGTACCTGTT
 3301 TGCTGCCAGT CGCGTATAGT CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC
 AGCGGGTCA CGCGTATAC CGACGAGATG CGCCAAACTGT AGTCTGCTCA TCAATGGCTA TCAATGGCTA TCAATGGCT
 CAGCCCGACT TGGAGCGAAC GACCTACCC GAACTGAGAT ACCTAGAGC TGTGCTGCA GAAAGGCGCA CGCTTCCGCA AGGAGAAAG
 GTGCGGTGCA ACTCTCGTTG CTGGATGTCG TGTGACTCTA TGTGATGCTC ACTCGTAATCT CTTTGGGGT GCGGAGGGT
 3401 TGAAGTCGCA GCTAAAAAACCA CTACGAGCAG TCCCTCGCC TCGGATGTCG TGTGATGCTC TGTGATGCTC
 ATCGGTAAAG CGCGAGGTCA GCGTCTTCA GGGAGTCTCA GGGGGAAAGC CTTGTTCTC CTTGTTCTC
 TAGGCCATT CGCGTCTTC CCGCTTCTGC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC
 3501 AGCGAGGTCA GTGAGTGTGAG CTTGACACAG GAGGAAGCGG AAGAGGCCCC ATAAAGGAAA TAAATGGCTA
 ACTTGAGGT CGTATTGTTGT GATGCTGTC AGGGGGGGGG TGTGCTGTT GCGGAGGG
 TCGCGTCTGC CAGTCAGTCTG TGTGCTGTT TGTGCTGTT GCGGAGGG
 3601 TGAAGTCGCA GCTAAAAAACCA CTACGAGCAG TCCCTCGCC TCGGATGTCG TGTGATGCTC TGTGATGCTC
 TTGCTCACA TGTGCTTCC CGCGTCTTC CCGCTTCTGC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC
 AGCGAGGTCA AGCGAGGTCA GCGTCTTCA GGGAGTCTCA GGGGGAAAGC CTTGTTCTC CTTGTTCTC
 TACAAACAC CTTAACACTC CGCTTATTGTT AAAGGTGTCG CTTGTCGAT ACTGGTACTA
 TCGCGTCTGC CAGTCAGTCTG TGTGCTGTT GCGGAGGG
 3701 GGTGCTGCCAGT CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC
 AACAGAGGTCA AGCGAGGTCA GCGTCTTCA GGGAGTCTCA GGGGGAAAGC CTTGTTCTC CTTGTTCTC
 AGCGAGGTCA GTGAGTGTGAG CTTGACACAG GAGGAAGCGG AAGAGGCCCC ATAAAGGAAA TAAATGGCTA
 TCGCGTCTGC CAGTCAGTCTG TGTGCTGTT GCGGAGGG
 3801 TGAAGTCGCA GCTAAAAAACCA CTACGAGCAG TCCCTCGCC TCGGATGTCG TGTGATGCTC TGTGATGCTC
 TTGCTCACA TGTGCTTCC CGCGTCTTC CCGCTTCTGC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC
 AGCGAGGTCA AGCGAGGTCA GCGTCTTCA GGGAGTCTCA GGGGGAAAGC CTTGTTCTC CTTGTTCTC
 TACAAACAC CTTAACACTC CGCTTATTGTT AAAGGTGTCG CTTGTCGAT ACTGGTACTA
 TCGCGTCTGC CAGTCAGTCTG TGTGCTGTT GCGGAGGG
 3901 GGTGCTGCCAGT CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC CGCGTCTTAC
 AACAGAGGTCA AGCGAGGTCA GCGTCTTCA GGGAGTCTCA GGGGGAAAGC CTTGTTCTC CTTGTTCTC
 ATGTGTGTCG GAAATTGTGAG CGGATAAACCA TTTCACACAG GAAACAGCTA TGTGCTGTT GCGGAGGG
 TACAAACAC CTTAACACTC CGCTTATTGTT AAAGGTGTCG CTTGTCGAT ACTGGTACTA
 TCGCGTCTGC CAGTCAGTCTG TGTGCTGTT GCGGAGGG
 4001 AACAGAGGTCA AGCGAGGTCA GCGTCTTCA GGGAGTCTCA GGGGGAAAGC CTTGTTCTC CTTGTTCTC
 ATGTGTGTCG GAAATTGTGAG CGGATAAACCA TTTCACACAG GAAACAGCTA TGTGCTGTT GCGGAGGG
 TACAAACAC CTTAACACTC CGCTTATTGTT AAAGGTGTCG CTTGTCGAT ACTGGTACTA
 TCGCGTCTGC CAGTCAGTCTG TGTGCTGTT GCGGAGGG
 4101 AACAGAGGTCA AGCGAGGTCA GCGTCTTCA GGGAGTCTCA GGGGGAAAGC CTTGTTCTC CTTGTTCTC
 TTGAGTTAAGAAGA AACTGAGGA TGTGTTTCTT CCGCTTCTC CTTGTTCTC
 AATGACAGA TGTGTTTCTT CTCATAGGTGAGC ATGATGCTG CTTGTTCTC CTTGTTCTC
 TTAGGTGTC CACAAATATAAGAAGA CTTAACAAAGC TGTGTTTCTT CCGCTTCTC CTTGTTCTC
 4201 AACAGAGGTCA AGCGAGGTCA GCGTCTTCA GGGAGTCTCA GGGGGAAAGC CTTGTTCTC CTTGTTCTC

Figura 19 (2 de 6)

Figura 19 (3 de 6)

6101 ACCTCTGGCG GCAGCCTAC AAGAACAACT GGACCGACCG GTGGTACCTC ACCCTTAACG AGTCGGCAC ACAGTGTGG TCGGCCACA CCAGACTAAG
TGGAGACCGC CGTGGATGG TTCTTGTGA CCTGGTGGC CACCATGGAG TGGGAATGGC TCAGGGCTG TGTACACCC AGGGGGCTGT GGTCTGATTC
PmlI -----

6201 AACCTAGAAC CTCGTGGAA AGGACCTAC ACAGCTCTGC TGACCAACCC CACCGCCCTC AAAGTAGACG GCATCGACG TGGATAAC
TTGGATCTG GAGGACCT TCCTGGAAT TGTCAGGAACT ACTGGTGGG GTGGGGAG TTTCATGCG CGTAGCGTGC AACCTATGT CGGGGGGTG
VH -----

Líder de CD8

PmlI

6301 TGAGGCTGC CGACCCGGG GGTGGACCAT CCTCTAGACT GGCATGGCTC TCCCAGTGC TGCCCTACTG CTTCCCTAG CGCTTCTCCT GCATGCAG
ACTTCGAGC GCTGGGGCC CCACCTGGTA GGAGATCTGA CGTACGGAG AGGGTACTG ACGGTACTG ATACGGTAC
VH -----

6401 CTTAACCTGC AGGACTCTC GTGAAACCTC GAGGAGCTC TCAAGCTC TTGAGACCT CTTGAGTGC TATGGCATCT
CAGTCGAGC TCCCTAGTC CCCTGGAA CACTGGAC CTTGGAC CTCAGGAA GACCTGGA GACCAAGTC AACGGTAC
VH -----

6501 CCTGGCTTCG CCTCTCTCG GAGATGGCC ACCGAAACATT ACCAGCTCTC GTGGTACAT CTTCATCTC GAAAGTAAAGA CTTGGCTG
GCGCCAAAGC GGACCTAGGC CTCCTACTCG ACCCTGGCA CGTGGTGGAA TGGTCAAGC CACCATGTA GAAGGAACT
VH -----

6601 CACCATTC CCAAGAAC CCTGGCTCG CAATGGCA CGCTGGTAC GCTGGTGGAA CCTGGTGGAA TGACACCTTC CGTCCCTAAG
CCTGAAAGG CTCCTGTTAC GGCTGGTGTG GGACGGAC GTCCTGGGT GTCCTGGGT
VH -----

Enlazador de glicina-serina (G4S) 3

6701 CGAAACTACG GGGAACTACTA TGGPATGGAC TACGGGGCC AAGGGACAC GGTCAACCGT TCCCGAGTG
CCATTGATGC CACTAATGAT ACCGATACTG ATGAAACCGG TTCCCTGGTG CGAGTGGCAG AGGAGTC
VH -----

Figura 19 (4 de 6)

6801	GAGGGGATC TGACATTGAG CTCACCCACT CTCCATCCTC CCTGGGTGTG TCAGCAGGAG AGAAGGTCAAC TATGAGCTGC AAATCCAGTC AGAGCTGCT CTCACACTAG ACTGAACTC GAGTGGCTA GAGGTAGGAG GGACCGACAC	VI	
6901	CAACACTAGA ACCCGAAAGA ACCAGCTTGGC TTGGTACCAAG CAAAAACCAAG GACAGCTCTCC TGAACACTCTG ATCTACTCGG CTCACCAACTAG GCAATCTCC TAGTCCAGTG ATACTCGACG TCTAGTCAG TCTCACAGCA	VI	
7001	GTCCTGATC GCTTCACAGG CAGTGGATCT GGGACAGATT TOACTCTCAC CATCAGCAGT GTGCAGGCTG AAGAACCTGGC AGTTTATTAC TGCCAGCAAT CAGGGACTAG CGAAAGTCTTC GTCACCACTAGA CCCTGTCTAA AGTGAGAGTC GTAGTCGTCA CACGTGAC TAGAATAATG ACGTCGTTA	VI	Dominios transmembrana + intracelular de CD28 (-TERMINACIÓN)
7101	CTATAATCT ACTCACCGTC GGTCCTGG ACAAAGCTGA GATCAAACGG GGGCCGCAA TTGAAGTTAT GTATCTCTCT CCTAACCTAG ACAATAGAA GAAATATAGA TGAGTGAAG CCAGGACCT CTAGTTGCCC	VI	NotI
7201	GAGCAATGGA ACCATTTATC ATGTAAGGG GAAACACCTT TGCCAAAGTC CCCTATTTC CGGACACCTCT AAGCCCTTTT GGTCGCTGGT GGTCGCTGGT CTCGTTACCT TGGTAATAGG TACACTTCC CTTTGTTGAA ACAGGTTCAAG GGGATAAAGG GCCTGGAAAA CCCACGACCA CCACCAACCA	VI	Dominios transmembrana + intracelular de CD28 (-TERMINACIÓN)
7301	GGAGTCCTGG CTTGCTATAG ACAGTGGCCT TTATTATTT CTGGGTGAGG AGTAAGAGGA GCAGGCTCT GCACAGTGAC TACATGAACA CCTCAAGGACCC GAACGATATC TGTCAACCGGA AATAATAAAA GACCCACTCC TCATTCTCT CGTCGAGGA CGTGTCACTG ATGTAATCTG	VI	Dominios transmembrana + intracelular de CD28 (-TERMINACIÓN)
7401	TGACTCCCG CGCCACCGGA AGCATTACCA GCCTATGCC CCACCAAGGG ACTTCGAGCC CTATGCTCC AGAGTGAAT TCAGGAGAG ACTGAGGGC GGGGGGGCCC GGGTGGCGT TCGTAATGGT CGGGATAACGG GGTGGTGGC TGAAGCTGCG GATAGCGAGG TCTCACTCA AGTCGTCCTC	VI	Dominio intracelular de cadena zeta de CD3
7501	CGCAAGGCC CCGCGTAC AGCAGGGCCA GAACCAAGCTC TATAACGGGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG GACTACGATG TTGGACAA GAGAGTGGC CGCTCAGGG GGGCCCATGG CTGTCCTCGAG ATATGCTCG AGTGTAGATCC CTCATGCTAC AACACCTGTT CTCTGAC	VI	Dominio intracelular de cadena zeta de CD3
7601	CGGGACCCCTG AGATGGGGGG AAAAGCCGAGA AGGAAGAACCC CTCAGGAAGG CCTGTACAT AAGATAAAGAT GGCGGAGGCC TACAGTGAGA GCCCTGGGAC TCTACCCOCCT TTTGGACCTCT TCCTTCGGCTCT CTTGAGCTTCA CGACATGTTA CTTGAGCTTC CCGCCTCCGGG ATGNCACCT	VI	Dominio intracelular de cadena zeta de CD3

Figura 19 (5 de 6)

7701	<p>TTGGATGAA AGCGAGC GC CGAGGGCA AGGGCAAGA TGGCTTTAC CAGGGTCTCA GTACAGCCAC CAAGGACCC TACGACGCC TTCACATGCA AACCTACTT TCCGCTCGCG GCCTTCCCCGT TCCCCGTCT ACCGAAATG GTCCACAGT CATGTCGCTG ATGCTGGGG AAGTGTACGT</p> <p>Dominio intracelular de cadena zeta de CD3</p>	XbaI
7801	<p>GCCCCGGCC CCGCTAAC AGCCACTCGA G CGGGGACGGG GGAGGATTC TCGGTGAGCT C</p>	XbaI

Figura 19 (6 de 6)

Figura 20A

1. Péptido 1 de MUC16-CD de ratón (SEQ ID NO:21)

TLDRKSVFVDGYSQRDD **19 AA**

2. Péptido 2 de 1^{er} bucle de cisteína de ratón (SEQ ID NO:22)

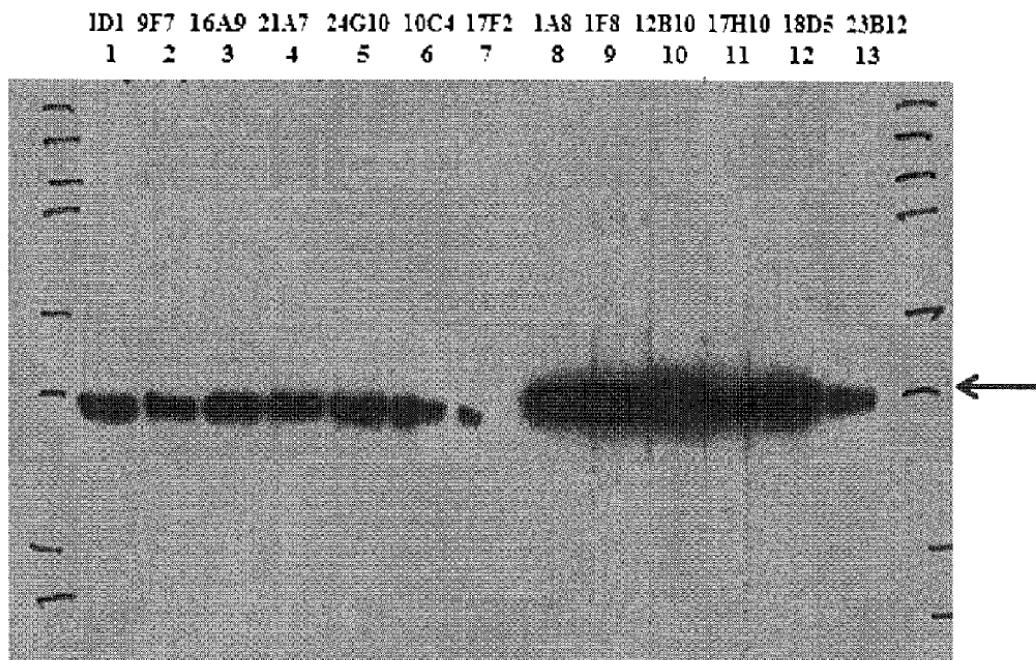
KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSL
CNF SPL **33 AA**

3. Péptido 3 de 2º bucle de cisteína de ratón (SEQ ID NO:23)

SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQN **32 AA**

Figura 20B
Alineamiento de secuencias de aminoácidos de MUC16 de ratón (SEQ ID NO:24) y
MUC16 humana (SEQ ID NO:25)

Figura 21
Péptido 1 de MUC16 CD de ratón



Péptido 3 de MUC16 CL de ratón

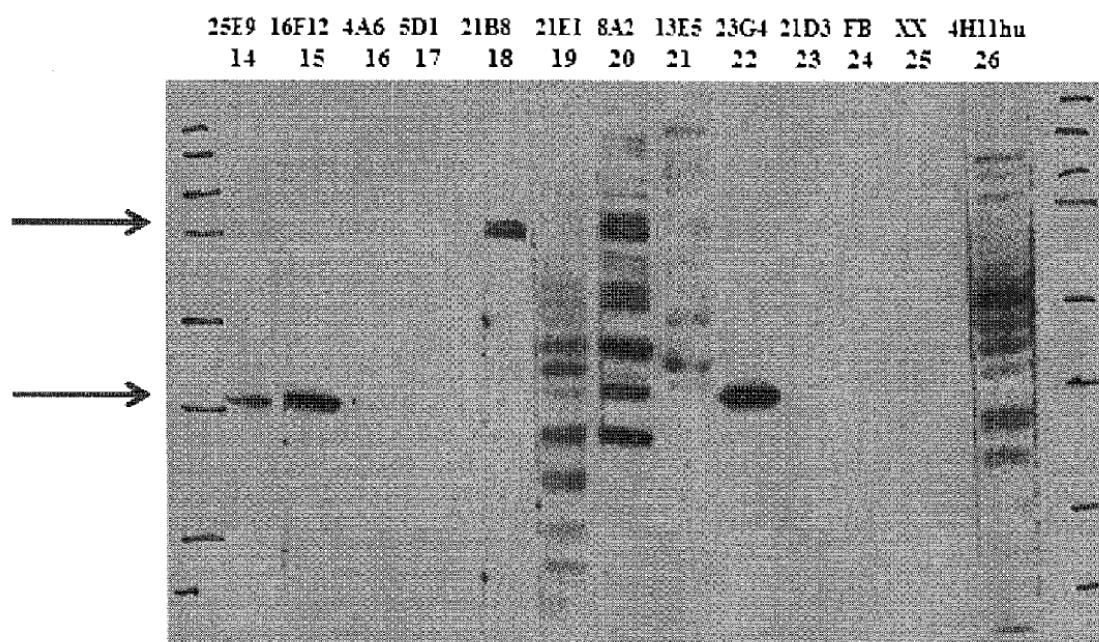
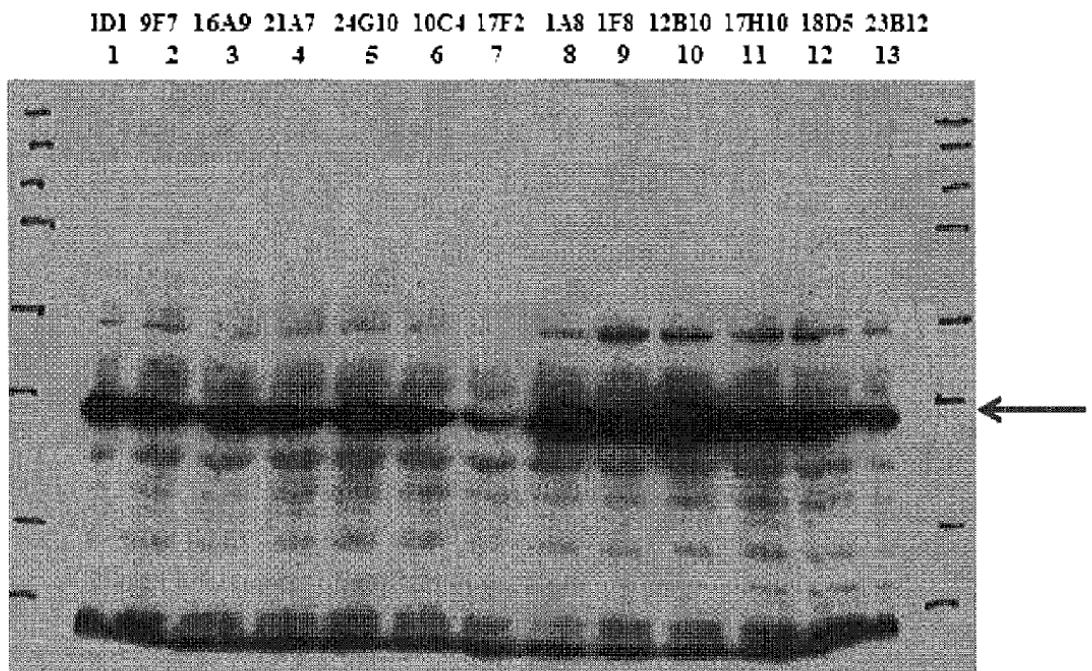


Figura 22

Péptido 1 de MUC16 CD de ratón



Péptido 3 de MUC16 CL de ratón

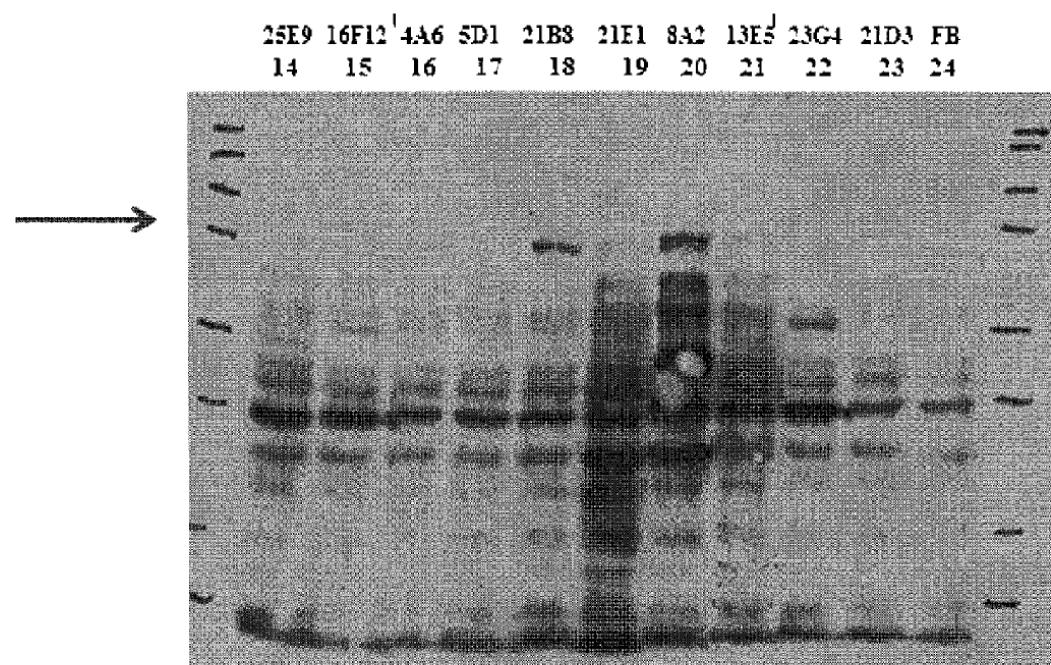
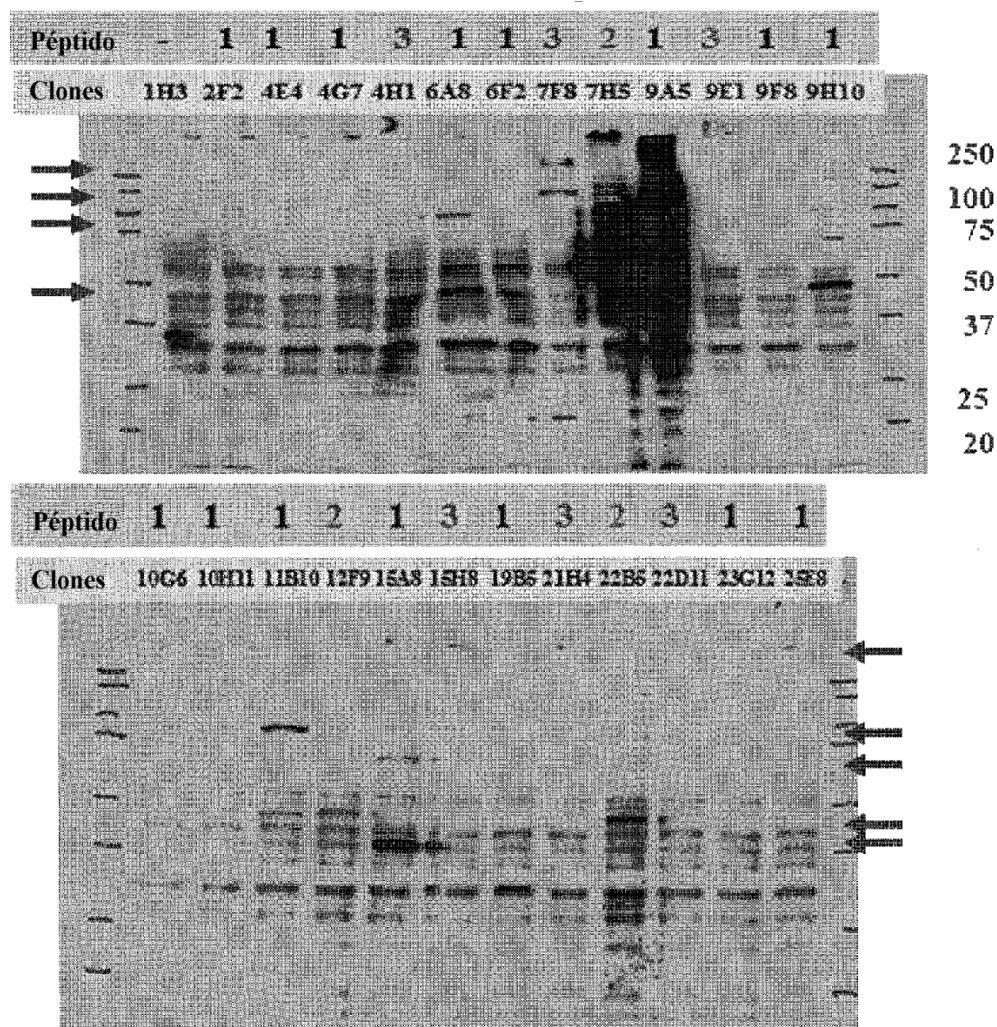
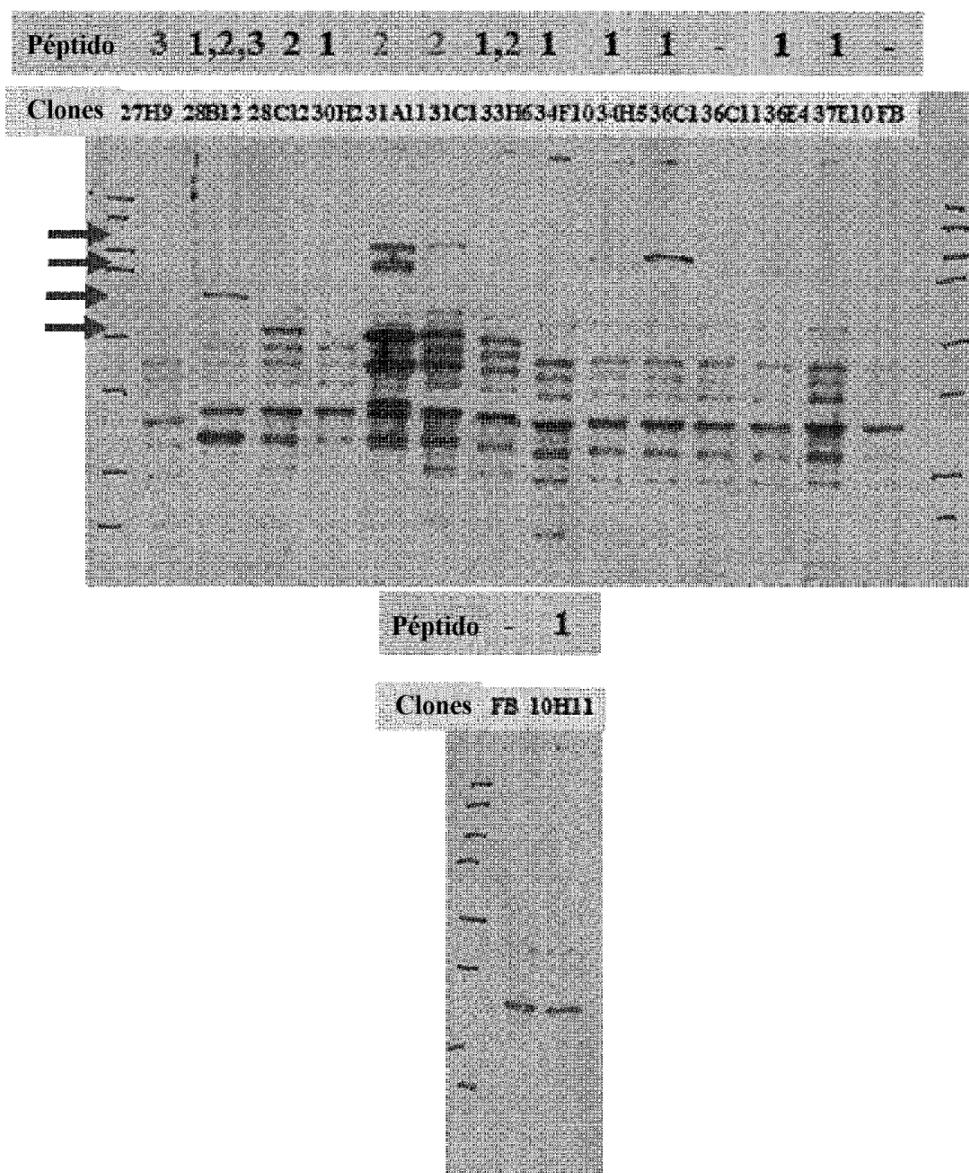


Figura 23





A. Secuencia de nucleótidos que codifica 12B10.3G10-V_H (SEQ ID NO:26)

GAGGTGARGCTGGAGGAGTCAGCTGGAGGATTGTCAGCTGACCCCTAAAGGATCATGAAACTCTCATGTGCCGCCTCTGGTTTACCTTCATACCTATGCCGCTGCACTGGGPOGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTATGGAAATGGTTCGGCTCGCATATGAGAAAGTAAAAGTGGAAATTATGCAACATATATGCGGATTCAGTCAGACAGATTCACCATCTCCACAAATGATTCAACAGAGCATGCTCTATCTGCAAAAGAAATACCTGAAAAGTGGGACACAGCCATATATTACTGTGTGAGAGGGGTAACAAACGGGCCCTTCTTACTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCCCTCTCTCA

B. Secuencia de aminoácidos de 12B10.3G10-V_H (SEQ ID NO:27)

EVKLEESGGGLVQPKGSILKLSKAASGFTFNTYAVHWVRQAPGKGMEWVARIRSKSGNYATYYADSVKDRFTISRNDQSMLYLQMNNLKTEDTAIYYCVRAGNNGAFPYWGQGTTVTVSS

C. Secuencia de nucleótidos que codifica 12B10.3G10-V_L (SEQ ID NO:28)

Observese que el VL tiene un sitio *NotI* opcional añadido por el cebador para clonación

GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCACTCTCTGATCTGGAGGAGTCACCATCACTTGCAAGGCTAGCCAGATATTAGAAGTATATAGCTTGGTACCCACAAACCTGGAAAAGACTCTCTGACTACTCATACATTTCACATCTACATTACAGACAGGCATCCCATCAAGGTTCAAGTGGACGTGGGGCTGGGAGAGACTATTCCCTCAGCAGTCAGCAACCTGGAGTCGAAGATATTGCAACATTAATTGCTACAGTATGATACTGTACACGTTGGAGGGGGACCAACCTGGAGATCAAACGGGCGCGCA

D. Secuencia de aminoácidos de 12B10.3G10-V_L (SEQ ID NO:29)

DIELTQSPSSLSASLGGRVITICKASQDIKKYIAWYQHKPGKTPRLIHFISTLQTGIPS
RFSGRGSGRDYSFSISNLSEDIATYYCLQYDSLTYIFGGGKLEIKRAAA

Figura 24

Figura 25

