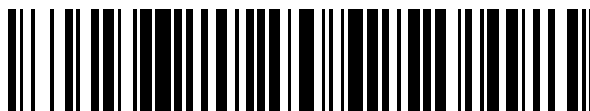


19



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 ectodominio 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.

## 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.

## 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 ectodominio de MUC16, y en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) codificada por SEQ ID NO: 06 y una cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) 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')<sub>2</sub> 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 ectodominio 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

(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.

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 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 activadas por fluorescencia (FACS), transferencia de Western, inmunoprecipitación y/o captura de imágenes radiográficas.

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

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.

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 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).

Figura 4: Análisis de transferencia de Western. Figura 4A: análisis de transferencia de Western de proteína de fusión GST- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> con anticuerpos monoclonales 9C9.21.5.13 y 4H11.2.5. Figura 4B: análisis de transferencia de Western de extracto de proteínas SKOV3-phrGFP- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> y SKOV3-phrGFP-AMUC16<sup>c334</sup> y explorados con anticuerpos monoclonales 9C9.21.5.13 y 4H11.2.5.

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- $\Delta$ MUC16<sup>c334</sup>.

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).

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- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> y SKOV3-phrGFP- $\Delta$ MUC16<sup>c334</sup>.

Figura 8: Secuencia de nucleótidos que codifica cadena pesada variable de anticuerpo (V<sub>H</sub>) y cadena ligera variable de anticuerpo (V<sub>L</sub>). (A) 4A5 V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 04), (B) 4A5 V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 05), (C) 4H11 V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 06), (D) 4H11 V<sub>L</sub> (E) 9B11 V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 08), (F) 9B11 V<sub>LA</sub> (SEQ ID NO: 09), (G) 9B11 V<sub>LB</sub> (SEQ ID NO: 10), (H) 24B3 V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 11), (I) 24B3 V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 12).

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.

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  $\zeta$ : dominio de señalización citoplasmático de cadena  $\zeta$  del receptor de linfocitos T; LTR: repetición terminal larga; caja negra: secuencia líder de CD8; caja gris: enlazador de  $(Gly_4Ser)_3$ ; 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<sup>+</sup> pero no los 19z1<sup>+</sup> se expanden en AAPC 3T3 (MUC-CD/B7.1). Se cocultivaron CAR<sup>+</sup> en monocapas de AAPC 3T3 (MUC-CD/B7.1) a  $3 \times 10^6$  linfocitos T CAR<sup>+</sup>/pocillo de una placa de 6 pocillos. Proliferación de linfocitos T CAR<sup>+</sup>, normalizada con respecto a la fracción de linfocitos T CAR<sup>+</sup> como se evaluó por FACS para la fracción CAR<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> se cocultivaron en monocapas de MUC-CD con (panel derecho) o sin B7.1 (panel izquierdo). Se cocultivaron  $3 \times 10^6$  CAR<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> se expandieron notablemente en comparación con linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> tras cocultivo con AAPC 3T3 (MUC-CD), \*\* $p=0,0023$  (4H11z en comparación con 4H11-28z). Por el contrario, los linfocitos T tanto 4H11z<sup>+</sup> como 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> pero no 4H11z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, a diferencia de los linfocitos T 4H11z<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup> como 4H11z<sup>+</sup> secretaron IFN $\gamma$ . \* $p=0,011$  (4H11z en comparación con 4H11-28z). Los linfocitos T de control 19z1 y 19-28z transducidos no consiguieron secretar IL-2 o IFN $\gamma$ . \*\* $p=0,0034$  (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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> de linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>. (A) El ensayo de citotoxicidad de linfocitos T 4H1z<sup>+</sup> y 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> autólogas en comparación con linfocitos T autólogos 19-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> como 4H11-28z<sup>+</sup> pero no linfocitos T 19-28z<sup>+</sup> 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 OV-CAR3(MUC-CD). Se tiñeron células OV-CAR3(MUC-CD) con anticuerpo 4-1BBL anti humano (línea gruesa) o con control de isotipo (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



nodulares. Se inyectó a ratones Beige SCID por vía intraperitoneal  $3 \times 10^6$  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<sup>+</sup> y 4H11-28z<sup>+</sup> retardan la progresión tumoral o erradican 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  $3 \times 10^6$  células tumorales OV-CAR3(MUC-CD) el día 1 seguido de  $3 \times 10^7$  de linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> o 4H11-28z<sup>+</sup> el día 2. Todos los ratones no tratados o ratones tratados con linfocitos T 19z1<sup>+</sup> de control desarrollaron tumores establecidos y se sacrificaron al día 50. Por el contrario, el 27 % de los ratones tratados con linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> o 4H11-28z<sup>+</sup> 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).

Figura 15. Linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> ip. (A) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones Beige SCID tratados ip o iv con linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup>. Se inyectó a ratones Beige SCID por vía intraperitoneal  $3 \times 10^6$  células tumorales OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) seguido de infusión iv o ip de  $3 \times 10^7$  linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup>. La erradicación tumoral se potencia después de infusión ip o iv de linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> en comparación con ratones tratados con control. Los ratones tratados con linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>. Por el contrario, la diferencia de supervivencia entre las cohortes de linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> ip e iv no fue estadísticamente significativa (p=0,22). (B) BLI de progresión tumoral de ratones tratados con linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> de control representativo. (C) Tráfico de linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> teñidos con CFSE inyectados de forma sistémica a tumores OV-CAR3(MUC-CD) ip avanzados. La presencia de linfocitos T de control 19-28z<sup>+</sup> marcados con CFSE inyectado iv (panel izquierdo) y linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> (panel derecho) 1 día después de la infusión en ratones Beige SCID con tumores OV-CAR3(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<sup>+</sup> pero no linfocitos T 19-28z<sup>+</sup> de control dentro de tumores OV-CAR3(MUC-CD) peritoneales.

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

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).

Figura 18: Secuencia de SFG\_4H11z.

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

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.

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

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

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

Figura 24: (A) Secuencia de nucleótidos que codifica 12B10-3G10-V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 26), (B) secuencia de aminoácidos 12B10-3G10-V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 27), (C) secuencia de nucleótidos que codifica 12B10-3G10-V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 28) (obsérvese que V<sub>L</sub> tiene un sitio *NotI* opcional añadido por el cebador para clonación, y (D) secuencia de aminoácidos de 12B10-3G10-V<sub>LA</sub> (SEQ ID NO: 29)

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

## Definiciones

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.).

El término “anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc.). La unidad 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 policlonal, anticuerpo monoclonal y anticuerpo quimérico.

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, épsilon y mu. El “dominio variable” también se denomina la “región F<sub>v</sub>” y es la región más importante para la unión a antígenos. Más específicamente, los bucles variables, tres cada uno en las cadenas ligera (V<sub>L</sub>) y pesada (V<sub>H</sub>) son responsables de unión con el antígeno. Estos bucles se denominan “regiones determinantes de complementariedad” (“CDR” e “idiotipos”).

El monómero de inmunoglobulina (Ig) de un anticuerpo es una molécula en forma de “Y” que contiene cuatro 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<sub>L</sub>”) y un dominio variable (“V<sub>L</sub>”). El dominio variable, V<sub>L</sub>, es diferente en cada tipo de anticuerpo y es la 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 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<sub>H</sub>”) y la región variable (“V<sub>H</sub>”). La región constante (C<sub>H</sub>) es idéntica en todos los anticuerpos del mismo 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 tándem (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<sub>H</sub>) de la cadena pesada difiere en anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B, pero es igual para todos los anticuerpos producidos por un único linfocito B o clon 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 presencia de un 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 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 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 antigénicos 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 afin” 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 epítipo. Las expresiones “epítipo” 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 epitipo puede competir con el antígeno intacto, del que deriva, por la unión con un anticuerpo.

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.

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.

“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 sinovio), 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.).

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

"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.

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.

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)).

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

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 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.

Los términos "aumentar", "elevar", "subir" y equivalentes gramaticales (incluyendo "superior", "mayor", etc.), cuando hace 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 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 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 ejemplifica 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.

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.

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

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).

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.

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<sup>c114</sup> 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.

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 inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS), transferencia de Western y/o detección por inmunoprecipitación.

La invención se describe además en (A) MUC16, (B) Anticuerpos de la Técnica Anterior, (C) Anticuerpos de la Invención, (D) Líneas Celulares de Hibridoma, (E) Conjugados de los Anticuerpos de la Invención Unidos a Agentes Citotóxicos 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 NH<sub>2</sub> 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 tándem 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 señalar 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 tándem 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 tándem.

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, vttrr rkkegeynvq qqcpgyyqsh 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 tándem. El “ectodominio de MUC16” se ejemplifica por nfsplar rvdraiyeeflrmtrngtqlqnlfdlrrsvldgyspnr 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 rvdraiyeeflrmtrngtqlqnlfdlrrsvldgyspnr nepltgnsdl p (SEQ ID NO: 01), que es del aminoácido 14394 al 14410 de SEQ ID NO: 13), y el Polipéptido 2 (tldrrsvldgyspnr nepltgnsdl p (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, cgvlvttrr 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 (vttrr 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 cqvstfrsvprnhhtgvdsic (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 tándem 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 (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).

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 epítomos de CA125 en los elementos repetidos, glucosilados en el dominio externo de la mucina unida MUC16, distantes del sitio de escisión potencial.

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

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 epítomos glucoproteicos complejos. Ya que estos epítomos 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.

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.

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.

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 RVDRVAIYEE FLMTRNGTQ 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 LVTTTR 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).

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).

De acuerdo con la invención, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a polipéptido de ectodominio 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- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> (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<sup>c114</sup> o lisados celulares de la línea celular SKOV3-phrGFP- $\Delta$ MUC6<sup>c114</sup> (Ejemplo 2, Figura 2).

En una realización adicional, los anticuerpos de la invención carecen de unión específica con un dominio extracelular de MUC16 glucosilado, ejemplificado por el CA-125 escindido descrito en Payne *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 7.202.346.

Las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de los anticuerpos de la invención, comprenden una cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) codificada por SEQ ID NO: 06 (es decir, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) del anticuerpo 4H11 de la Figura 8) y una cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) codificada por SEQ ID NO: 07 (es decir, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) 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<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> está fusionada con una región constante de inmunoglobulina humana.

La divulgación enseña un anticuerpo que se une específicamente al Polipéptido 2 (SEQ ID NO: 02) del polipéptido de ectodominio de MUC16, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) codificada por SEQ ID NO: 04 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) del anticuerpo 4A5 de la Figura 8), y una cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) codificada por SEQ ID NO: 05 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) del anticuerpo 4A5 de la Figura 8). El anticuerpo puede ser quimérico en el que al menos una de las cadenas V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> está unida covalentemente con una región constante de inmunoglobulina humana.

La divulgación enseña un anticuerpo que se une específicamente al Polipéptido 1 (SEQ ID NO: 01) del polipéptido de ectodominio de MUC16, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) codificada por SEQ ID NO: 08 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) del anticuerpo 9B11 de la Figura 8), y una cadena ligera variable (V<sub>L</sub>) codificada por al menos una de SEQ ID NO: 09 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable (V<sub>LA</sub>) del anticuerpo 9B11 de la Figura 8) y SEQ ID NO: 10 (es decir, la secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable (V<sub>LB</sub>) del anticuerpo 9B11 de la Figura 8). El anticuerpo puede ser quimérico en el que al menos una de las cadenas V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> está unida covalentemente con una región constante de inmunoglobulina humana.

Aunque sin pretender restringir la fuente de antígeno a la que se unen los anticuerpos de la invención, en una realización, el polipéptido de ectodominio 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- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> (Ejemplo 2).

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 CGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQ (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 se une a células SKOV3 transducidas con phrGFP- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> (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.

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 VNRHHTGVD SLCNFSPL (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).

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 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'.

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, 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.

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 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 procariontas, 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 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.

La "región Fc" y el "fragmento, región cristizable" 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 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.

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 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 hamsters, 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 (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 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 quiméricos. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" 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 quiméricos incluyen inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada mediante enlaces disulfuro con una cadena L quimérica. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) formado por dos dímeros HL asociados mediante al menos un enlace disulfuro. También puede producirse un anticuerpo quimérico 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 quiméricos 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 quiméricos 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).

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 inmunorradiométricos, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos in situ (por ejemplo, usando oro coloidal, marcadores enzimáticos o radioisotópicos), transferencias 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 inmunoelectroforesis, etc.

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.

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 ejemplifica 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.

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 ejemplifica por 4H11.2.5, 13H1, 29G9, 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 ejemplifica 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 ejemplifica por 31A3.5.1, 19D1, 10F6, 22E10, 22F1, 3H8, 22F11, 4D7, 24G12, 19G4, 9A5, 4C2, 31C8, 27G4 y 6H2 (Tablas 1 y 2). El anticuerpo puede ser 31A3.5.1.

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 SLCNFSPL (SEQ ID NO: 15), en el que el anticuerpo se ejemplifica por 24B3 y 9C7 (Tabla 2).

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, es decir, el porcentaje de sujetos sanos que se identifican correctamente como sin enfermedad. La especificidad puede calcularse de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

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 %, 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).

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 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 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 %, 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 policlonales).

La divulgación enseña líneas celulares de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido, o parte antigénica 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 LVTTTRR 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.

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.

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).

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).

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-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina (MMAF) y monometil auristatina E (MAE) (Patente de Estados Unidos n.º 7.662.387).

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  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  y  $^{211}\text{At}$ , o un emisor beta seleccionado del grupo que consiste en  $^{186}\text{Re}$  y  $^{90}\text{Y}$ , o un emisor gamma  $^{131}\text{I}$  (Patente de Estados Unidos n.º 7.666.425).

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).

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).

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

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 afín, 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.

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,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  y/o  $^{125}\text{I}$ ), 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 rústico).

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)).

Por lo tanto, los anticuerpos de la invención pueden emplearse en inmunoensayos, tales como ensayos de unión competitivos, ensayos de tipo sandwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación, 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.

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.

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.

### 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 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 también son aplicables a cáncer primario, cáncer metastásico y cáncer recurrente.

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 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 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.

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).

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.

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).

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 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.

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  $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> 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  $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> 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- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> 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  $0,5 \times 10^6$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 ratón de control de isotipo coincidente no específicos (13C4 para IgG1 y 4E11 para IgG2b monoclonales obtenidos de la Instalación Central Monoclonal de 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 CO<sub>2</sub> 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 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 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.

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

se marcaron anticuerpos monoclonales purificados con <sup>131</sup>I 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 radiomarcados, 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 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 cuadrados (Origen, Microcal, Software Inc., Northampton, MA) para determinar los valores de K<sub>d</sub> y B<sub>máx</sub> y se realizó una transformación de Scatchard.

Se realizaron estudios de internalización de células de anticuerpos con anticuerpos monoclonales <sup>131</sup>I-4H11 y <sup>131</sup>I-OC125 y células transfectadas estables SKOV3-phrGFP-ΔMUC16<sup>c334</sup>. 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 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 <sup>131</sup>I no unido.

#### 55 **Micromatriz tisular (TMA):**

Se construyeron micromatrices 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 medían 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 micromatrices tisulares en sí mismas para evitar efectos de deshile. La composición específica de cada micromatriz tisular se define posteriormente. Se prepararon portaobjetos de micromatrices 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 secaran, 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 amoniacal, 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.

## Puntuación de inmunohistoquímica:

Los anticuerpos disponibles en el comercio, tales como OC125 y M11, se dirigen a epítomos 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.

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.

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- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> 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<sup>c114</sup>, análisis de FACS y células de tipo silvestre OVCAR3

Tabla 1A

ELISA Hibridoma a Sob (1:1)	Péptido 1		ELISA Hibridoma a Sob (1:1)	Péptido 2		Isotipo	ELISA Hibridoma a Sob (1:1)	Péptido 3		Isotipo
	(1:10) GST- MucCD Western +/-	(1:1) OVCAR3 FACS +/-		(1:10) GST- MucCD Western +/-	(1:1) OVCAR3 FACS +/-			(1:10) GST- MucCD Western +/-	(1:1) OVCAR3 FACS +/-	
10A2	+	-	13H1	Débil	-	IgG1	22E10	+	-	IgG2b
23D4	-	-	28F8	+	+	IgG1, IgM	22F11	Débil	-	IgM IgG1, IgM
2F4	Débil	-	11B6	-	-	IgM	19G4	Débil	-	
9B11	Débil	+/-	4C7	+	-	IgM	31A3	Débil	-	IgG1
23D3	Débil	+	28F7	+	+	IgM	4C2	+	-	IgG1, IgM IgGM
30B1	-	-	9C7	+	+		27G4	+	-	
31B2	+	-	9C9	+	+	IgG1, IgG2b	19D1	+	-	IgG2b
			4H11	+	+	IgG2b, IgM	22F1	+	-	IgG2b, IgM
			4A2	-	-	IgG1	4D7	+	-	i IgG3
			4A5	+	+	IgG1	9A5	-	-	IgM
			29G9	+	-	IgG1	31 C8	-	-	IgG2b
			5C2	+	+	IgG1	6H2	Débil	-	IgG1, IgM
			23G12	-	-	IgG1, IgG2a	10F6	-	-	IgG1
			25G4	-	-	IgG1, IgM	3H8	+	-	IgG1, IgM
			26B2	+	+	IgG1, IgG2b, IgM	24G12	-	-	IgG1, IgM
			25H3		-	IgG1, IgM				
Tabla 1B										
Péptido 1			Péptido 2			Péptido 3				
		OVCAR3 FACS +/-	Isotipo		OVCAR3 FACS +/-	Isotipo			OVCAR3 FACS +/-	Isotipo
9B11.20.16		+/-	IgG <sub>1</sub>	9C9.21.5.13	+	IgG2b	31A3.5.1	-	-	IgG1

[illegible]

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

## 1. Polipéptido 1 de Muc16:

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

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)  
 TLDRSSVLVDGYSPNRNE (SEQ ID NO:02) 18aa

Son monoclonales de ratón que son específicos para este péptido:

4H11.2.5 (IgG2b)	13H1 (IgG1)	29G9 (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)
26F7.18.10 (IgG1)		

---

10

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

14472 14492 (secuencia de MUC16)  
 CGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQ 21aa

Son monoclonales de ratón que son específicos para este péptido:

31A3.5.1 (IgG1)	19D1 (IgG2b)	10F6 (IgG1)
22B10 (IgG2b)	22F1 (IgG2b, IgM)	3H8 (IgG1, IgM)
22F11 (IgM)	4D7 (IgG3)	24G12 (IgG1, IgM)
19Q4 (IgG1, IgM)	9A5 (IgM)	
4C2 (IgG1, IgM)	31C8 (IgG2b)	
27G4 (IgM)	6H2 (IgG1, IgM)	

---

14452 14475  
 FWAVILGLAGLLGLITCLICGYL (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)  
 KSYFSDCOVSIFRSVPNRHHTGVDSLGNFSPL (SEQ ID NO:15) 32aa



Son monoclonales de ratón que son específicos para este péptido:

24B3 (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
2A8	IgG1 kappa
24G12	IgG1 kappa
15D5	IgG1 kappa
6E2	IgM, IgG1, IgG3, IgG2a, kappa
7E6	IgM, kappa, lambda
7G11	IgM kappa
20C3	IgG1, IgG2b
9A3	IgM kappa
15B6	IgM kappa
19D3	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
24F8	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- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup>. Los anticuerpos dirigidos contra MUC16 comerciales (OC125, M11 o VK8) no se unieron con GST- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> 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- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> (Tabla 1B), y se aislaron anticuerpos monoclonales purificados seleccionados.

Los inventores usaron las células OVCAR3 de tipo silvestre y SKOV3 transducidas con phrGFP-4MUC16<sup>c114</sup> 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- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup>. Los anticuerpos contra el Polipéptido 3 requirieron permeabilización ya que es un epítipo interno (Figura 7).

El análisis de transferencia de Western usando la proteína purificada GST- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> mostró fuerte unión con los anticuerpos 4H11 y 9C9 (Figura 4A), mientras que los otros anticuerpos seleccionados mostraron menos unión. El transfectante SKOV3-phrGFP- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> 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- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup> o lisados celulares de la línea celular SKOV3-phrGFP- $\Delta$ MUC16<sup>c114</sup>.

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 epítipos 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<sup>c334</sup> transfectada que porta el extremo carboxilo terminal de MUC16, incluyendo el epítipo de 4H11 y una única secuencia de repetición en tándem 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 <sup>131</sup>I mostró rápida internalización a un alto nivel, mientras que el anticuerpo OC125 marcado con <sup>131</sup>I se internalizó a una tasa mucho menor (Figura 5B).

### Ejemplo 3

#### 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

Se tiñeron portaobjetos de micromatrices 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 micromatrices tisulares de OC125 mostraron 279 (66 %) núcleos con tinción 3-5, 99 (24 %) con tinción 1-2 y 41 (10 %) sin tinción. Las micromatrices 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, 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

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 citoplasmática granular. Algunos tumores con lámina intracitoplasmática también captaron la tinción de OC125. 4H11 mostró un rubor citoplasmático más difuso sin acentuación membranosa.

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 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.

## C. Adenocarcinomas de pulmón, pancreáticos y prostáticos

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						

## D. Tejidos normales

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 tiñeron ambas 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, epidídimo, 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.

#### Ejemplo 4

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

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 primarios. 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.

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

- 35 **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<sup>+</sup> 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). 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 de longitud de fragmento monocatenario (scFv), derivado de 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  $\zeta$  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.

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<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> 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.

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.

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 epítomos presentes en la fracción de CA-125 secretada grande de la glucoproteína, sin saberse que ninguno se una 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.

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<sup>+</sup> *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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> y linfocitos T de donantes sanos que se dirigían a células de carcinoma ovárico derivado de líquido ascítico primario de pacientes de cáncer.

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<sup>+</sup> 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 estreptomina 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*

- 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 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 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, 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 pseudotipificados VSV-G derivados de fibroblastos gpg29 transducidos para construir líneas celulares productoras de retrovirus 40 pseudotipificados por envoltura de virus de leucemia de gibbon (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 alícuotas de 1x10<sup>6</sup> linfocitos T en 1 ml de medio RPMI complementado en cada pocillo de placas recubiertas con RN, junto con 1 ml de sobrenadante 50 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.

- 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 55 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 pseudotipificados 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 65 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<sup>+</sup>*

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 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 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*

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 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 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*

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<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup>.

*Ensayos de detección de citocinas*

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*

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 10<sup>6</sup> OV-CAR3(MUC-CD), o para estudios de captura de imágenes bioluminiscentes (BLI) 3 x 10<sup>6</sup> células tumorales OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc). Posteriormente, se inyectaron 3 x 10<sup>7</sup> linfocitos T CAR<sup>+</sup> ip o iv el día 1 o 7 después de la inyección tumoral como se indica. Los ratones se 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*

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 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*

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 policlonal 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 (Ansell Corporation, Bayport, MN). Se tiñeron células 3T3(MUC-CD) y OV-CAR3(MUC-CD) con anticuerpo 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<sup>+</sup> 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.

**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 transdujeron 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<sup>+</sup> de segunda generación se expandieron notablemente en comparación con linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> tras cocultivo con AAPC 3T3(MUC-CD). Por el contrario, linfocitos T tanto 4H11z<sup>+</sup> como 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> y 19-28z<sup>+</sup> de control y linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> de primera generación (Figura 12B). La secreción de IFNγ fue comparable entre linfocitos T activados 4H11z<sup>+</sup> y 4H11-28z<sup>+</sup>.

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<sup>+</sup> como 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> (Figura 12D). Se generaron datos similares con linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> expandidos (datos no mostrados).

*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<sup>+</sup> y 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> primarias autólogas de la misma muestra ascítica en comparación con linfocitos T modificados para expresar el CAR 19-28z de control (Figura 13C).

Se evaluó adicionalmente la capacidad de linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> y 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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, 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).

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

Para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> y 4H11-28z<sup>+</sup>, 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 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.

Para evaluar la eficacia antitumoral *in vivo* de linfocitos T dirigidos 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<sup>+</sup> o 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> y 4H11-28z<sup>+</sup> (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<sup>+</sup> y no tratadas.

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<sup>+</sup> en ratones Beige SCID que portaban tumores OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc) ip. Los ratones tratados con linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> tanto ip como iv mostraron supervivencia estadísticamente potenciada en comparación con cohortes de control tratadas con linfocitos T 19-28z<sup>+</sup> 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 tratados con ip e iv era estadísticamente equivalente por análisis de rangos logarítmicos. Estos datos implican el transporte exitoso de linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> infundidos iv a tumores peritoneales. Se confirmó adicionalmente el transporte de linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> marcados con CFSE infundidos iv al peritoneo por análisis de FACS de suspensiones celulares individuales de tumores OV-CAR3(MUC-CD) macerados (Figura 15C).

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

Para evaluar adicionalmente si los linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> 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 potente actividad antitumoral *in vivo* mediada por linfocitos T dirigidos a MUC-CD incluso en la situación de enfermedad avanzada.

## **Discusión**

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 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.

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 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).

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 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 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.

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 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 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).

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 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 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<sup>+</sup> secretaron niveles significativamente mayores de 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.

Se evaluó a continuación la capacidad de linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> y 4H11-28z<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> como 4H11-28z<sup>+</sup> se expandieron después de cocultivo con tumor *in vitro*. Para definir la etiología de esta expansión de linfocitos T 4H11z<sup>+</sup> 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 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<sup>+</sup> halogénicos donadores sanos así como linfocitos T de sangre periférica de pacientes 4H11-28z<sup>+</sup> más significativamente autólogos. Estos datos apoyan fuertemente el argumento de que el tratamiento con linfocitos T CAR<sup>+</sup> basados en 4H11 autólogos son prometedores en aplicaciones clínicas futuras.

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<sup>+</sup>, 4H11-28z<sup>+</sup> y 19z1<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> como 4H11-28z<sup>+</sup> en comparación con 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<sup>+</sup> 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. 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.

Finalmente, se evaluó la capacidad de linfocitos T 4H11-28z<sup>+</sup> 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 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> y CDS<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> para evaluar la actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Para este fin, los estudios continuados abordarán el papel de subconjuntos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> 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 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.

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 de un ensayo clínico de fase I en pacientes con carcinomas ováricos persistentes o recidivantes después de terapia inicial con cirugía y quimioterapia. [jff]

## Ejemplo 5

### Inducción de anticuerpos monoclonales de MUC16 de ratón en ratones y hámsteres.

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 MUC16 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 bazos 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 CO<sub>2</sub> 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 antigénica 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 ratón		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	PEPTIDO	Pocillo de fusión	Clonado	Clones			
-	1	01D01	sin éxito				
-	1	09F07					
IgG 1	1	16A09					
-	1	21A07					
-	1	24G10					
IgG 1	1	10C04	sí	10C4-3H5	10C4-1F2	10C4-2H8	10C4-1G7
IgG 1	1	17F02	sí	17F2-3G5	17F2-3F6	17F2-2F9	17F2-1E11
IgG 2b	1	01A08	sí				
IgG 2b	1	01F08					
IgG 2b	1	12B10		12B10-3F7	12B10-3G10	12B10-2F6	12B10-2F10
IgG 2b	1	17H10					
IgG 2b	1	18D05					
IgG 2b	1	23B12	sin éxito				
IgG 2b	1	25E09					
IgM	1	16F12					
IgG 1	3	04A06					
IgG 1	3	05D01					
IgG 1	3	21B08	sí	21B8-1H11	21B8-3G6	21B8-3H9	21B8-1G8
IgG 1	3	21E01	sí	21E1-1E3	21E1-1G9	21E1-2G7	21E1-3G12
IgM	3	08A02					
IgM	3	13E05					

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 criosecciones de líneas celulares ID8 (ratón), OVCAR-3 (humana), BR5-FVB1 (de ratón) y 13,5 días de embrión. Se exploraron secciones en parafina o criosecciones 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<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> 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.
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.
- 55 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.
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.
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. 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.
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 ISOBM TD-1 Workshop. *Tumour Biol* 1996; 17(6): 325-31.
22. Markwell MA, Fox CF. Surface - specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1,3,4, 6-tetrachloro-3alpha,6alpha-diphenylglycouril. *Biochemistry* 1978; 17: 4807-4817.
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): 844-7.
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. 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.
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

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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
28. Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes *Immunol Rev* 2008; 222: 101-16.
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.
30. Badgwell D, Bast RC, Jr. Early detection of ovarian cancer. *Dis Markers* 2007; 23(5-6): 397410.
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.
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.
- 50 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 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.
2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
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.
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.
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')<sub>2</sub> y un fragmento Fv.
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.
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.
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.
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.
11. Una célula de hibridoma que produce un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1.
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.
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.
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.
15. Un método *ex vivo* para identificar que un sujeto tiene un cáncer en el que se expresa MUC16, en donde dicho método comprende
  - (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 afin; y
  - (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.
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.
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)

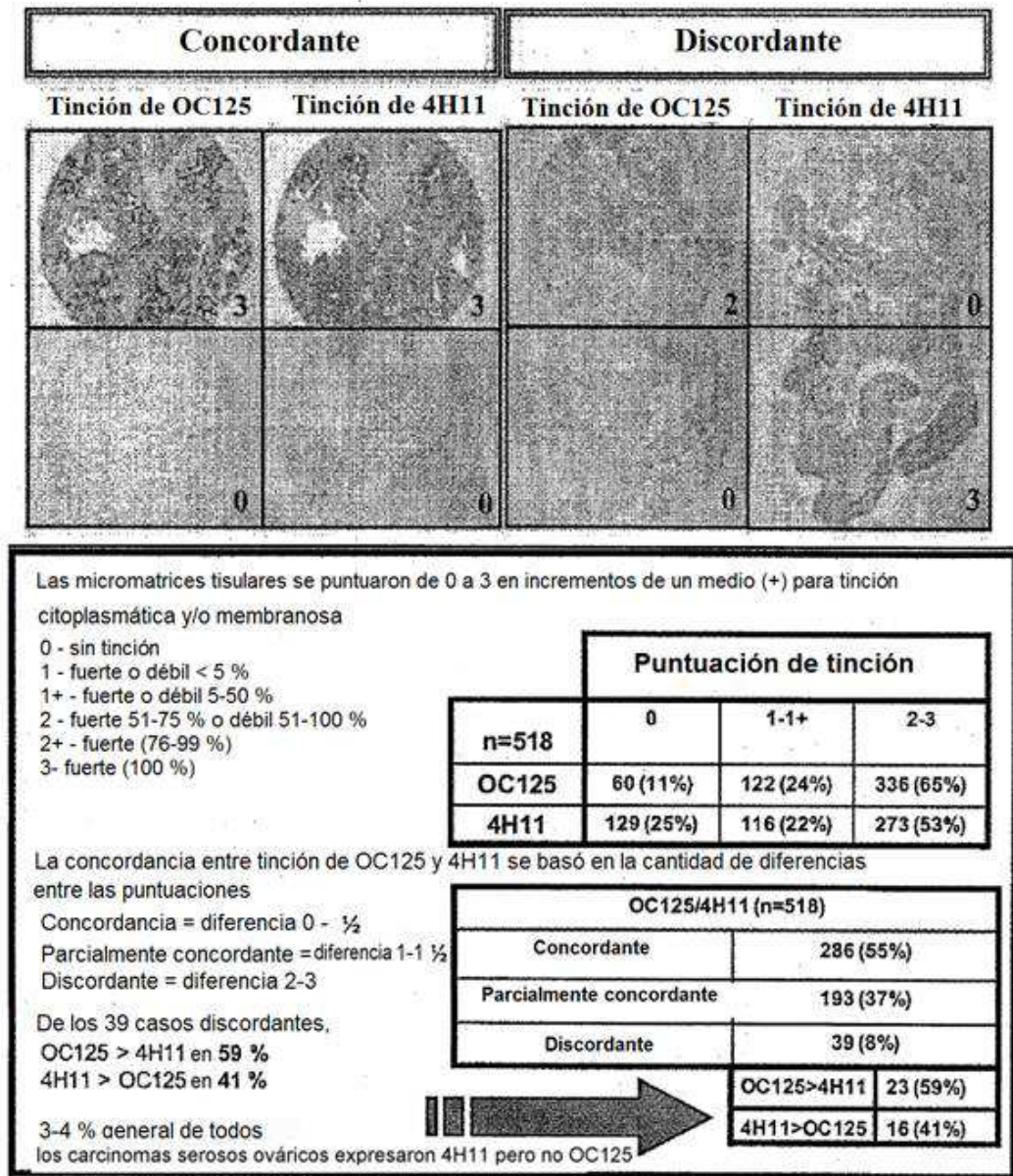
Péptido 2 antes de transmembrana:

TLDRSSVLVDGYSPNRNE (SEQ ID NO:02)

Péptido 3 dentro de transmembrana:

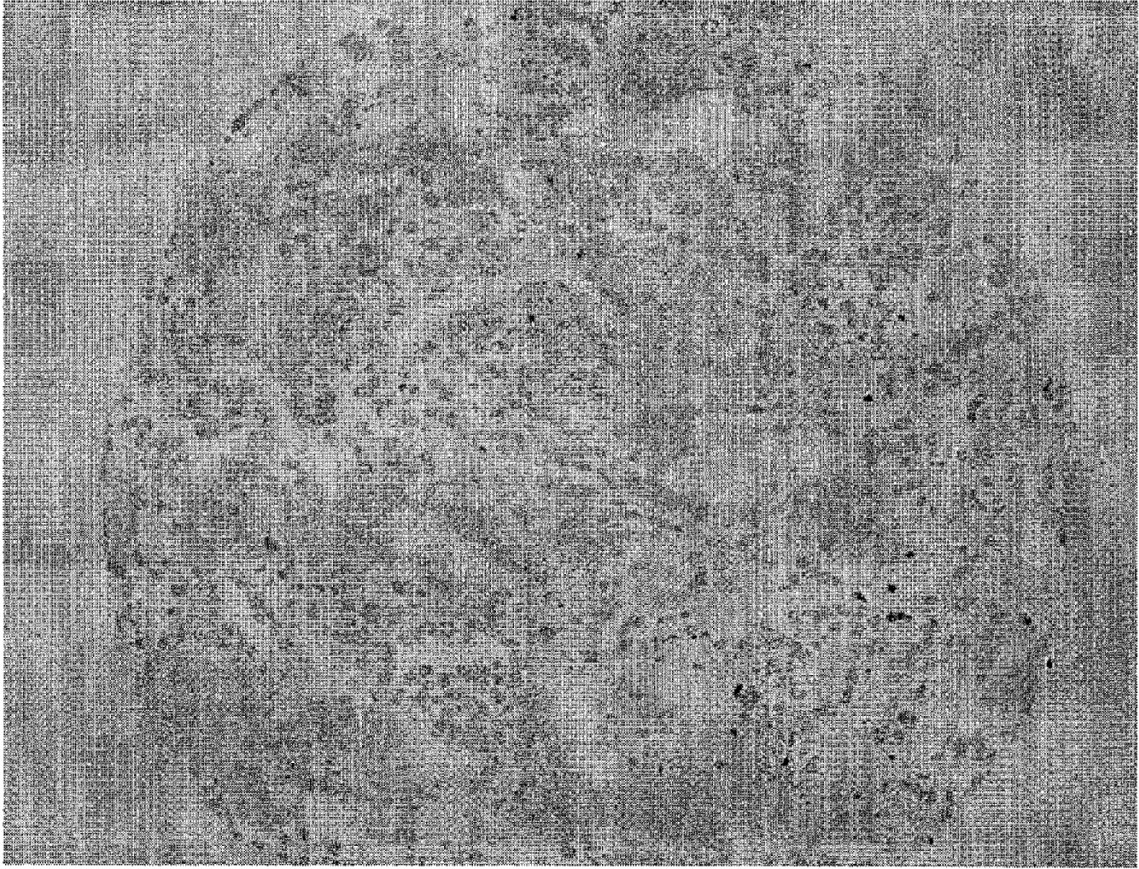
CGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQ (SEQ ID NO:03)

**FIGURA 1**



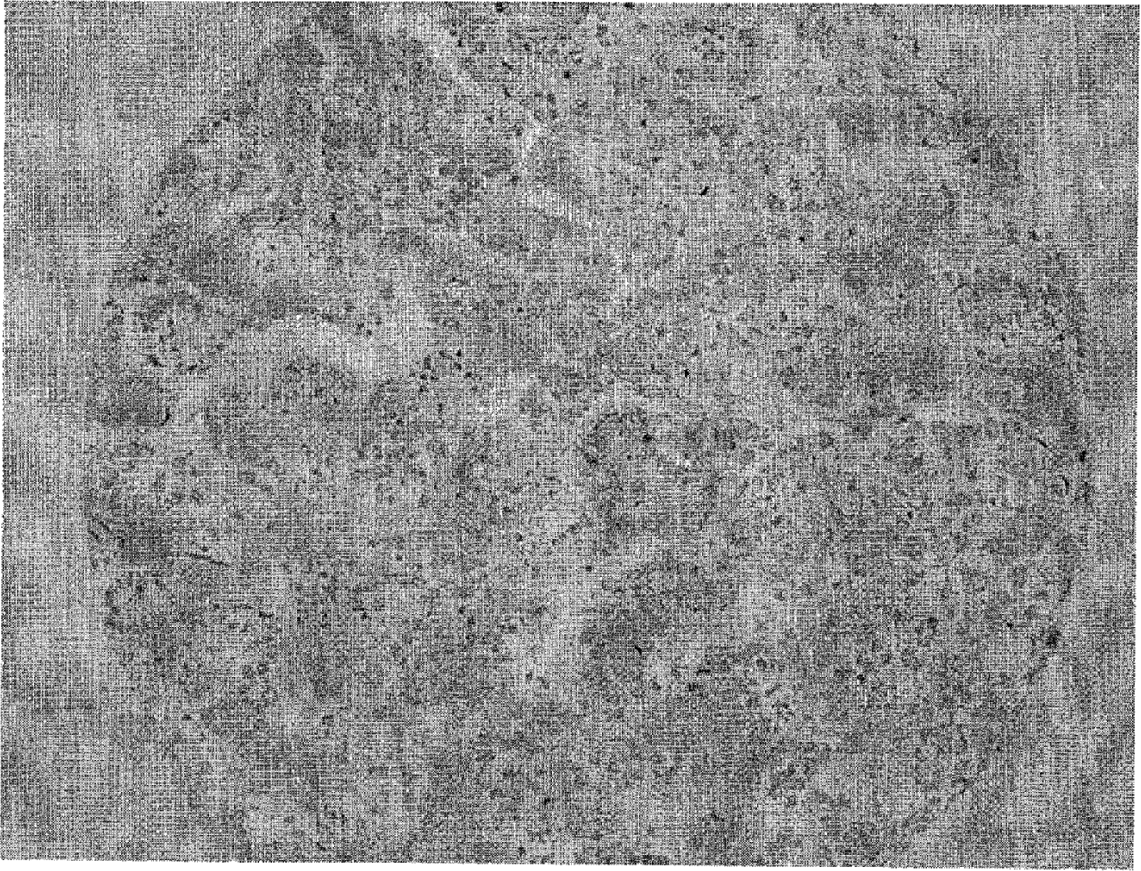
**FIGURA 2**





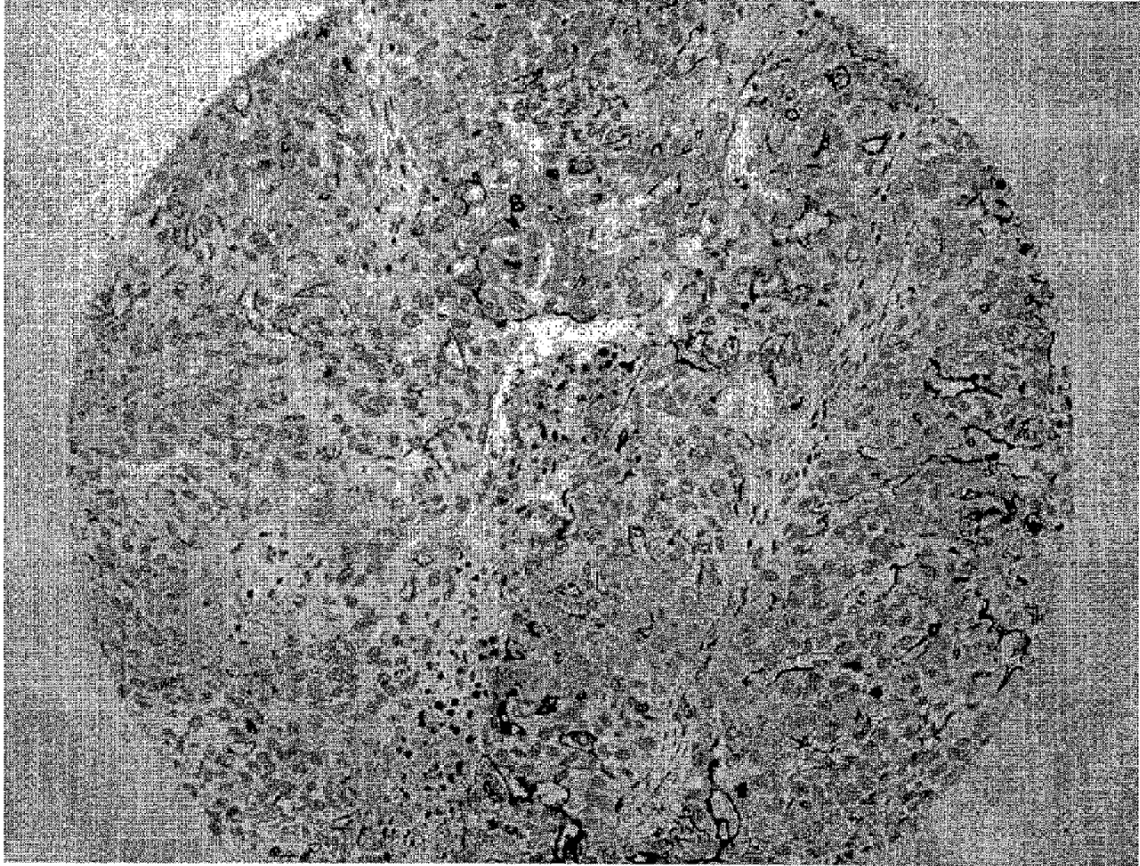
**FIGURA 3A**





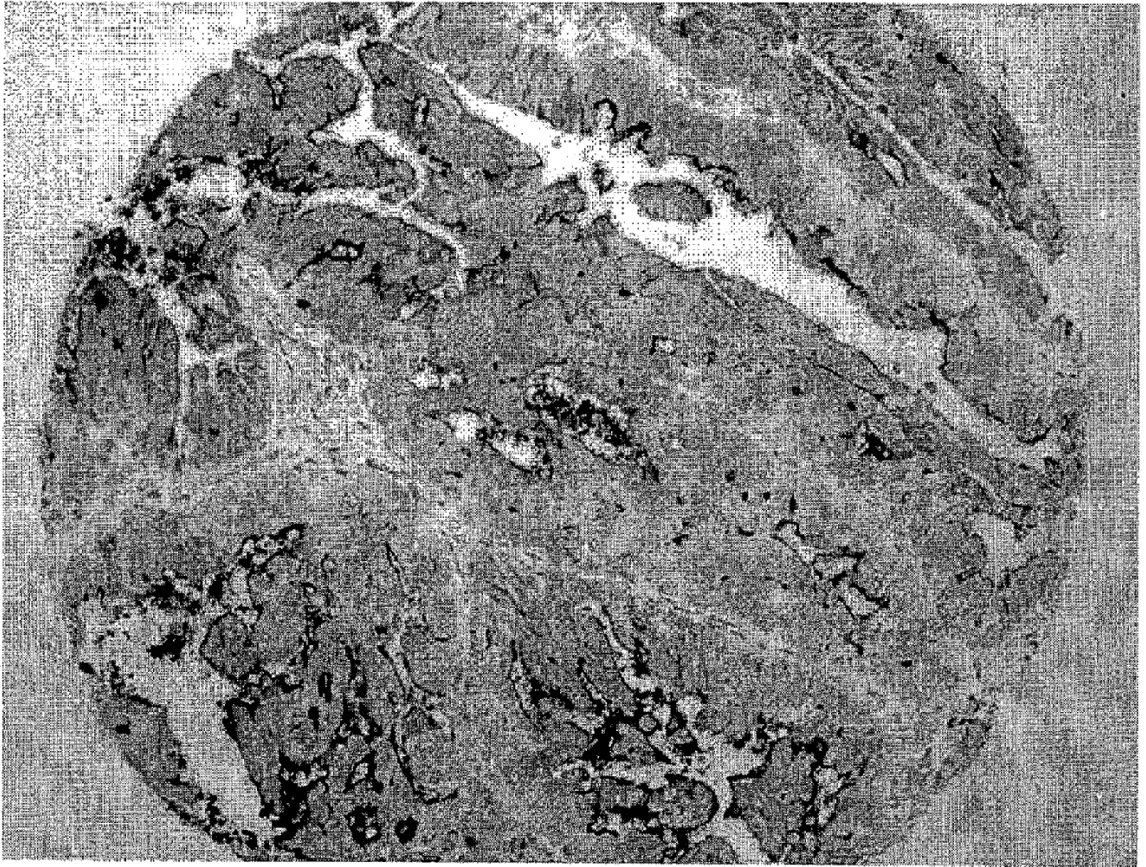
**FIGURA 3B**





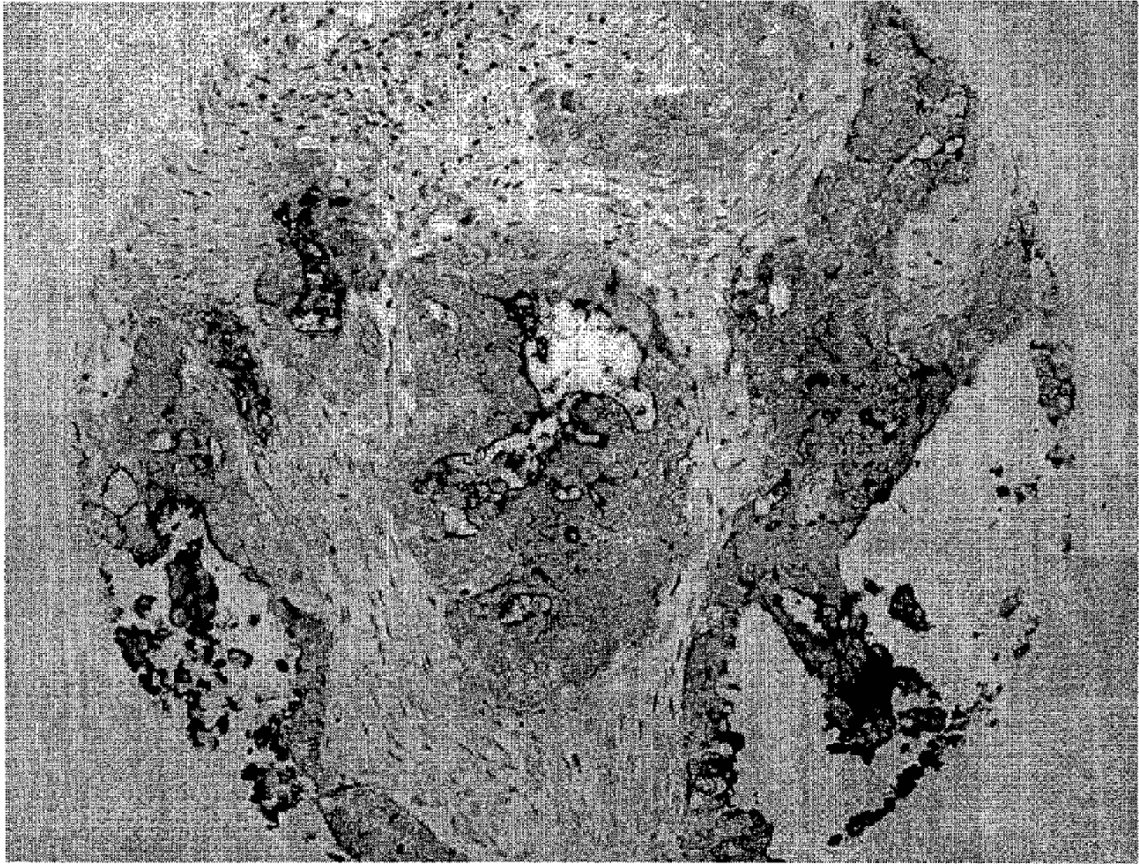
**FIGURA 3C**





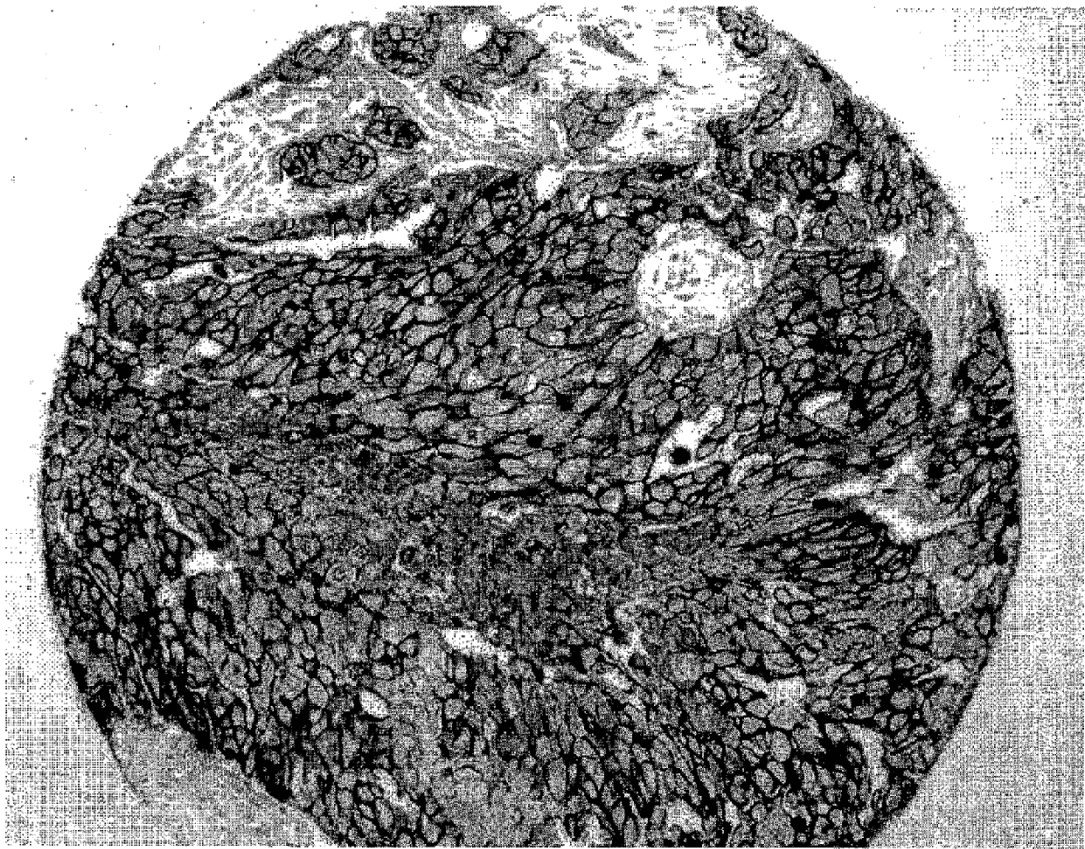
**FIGURA 3D**





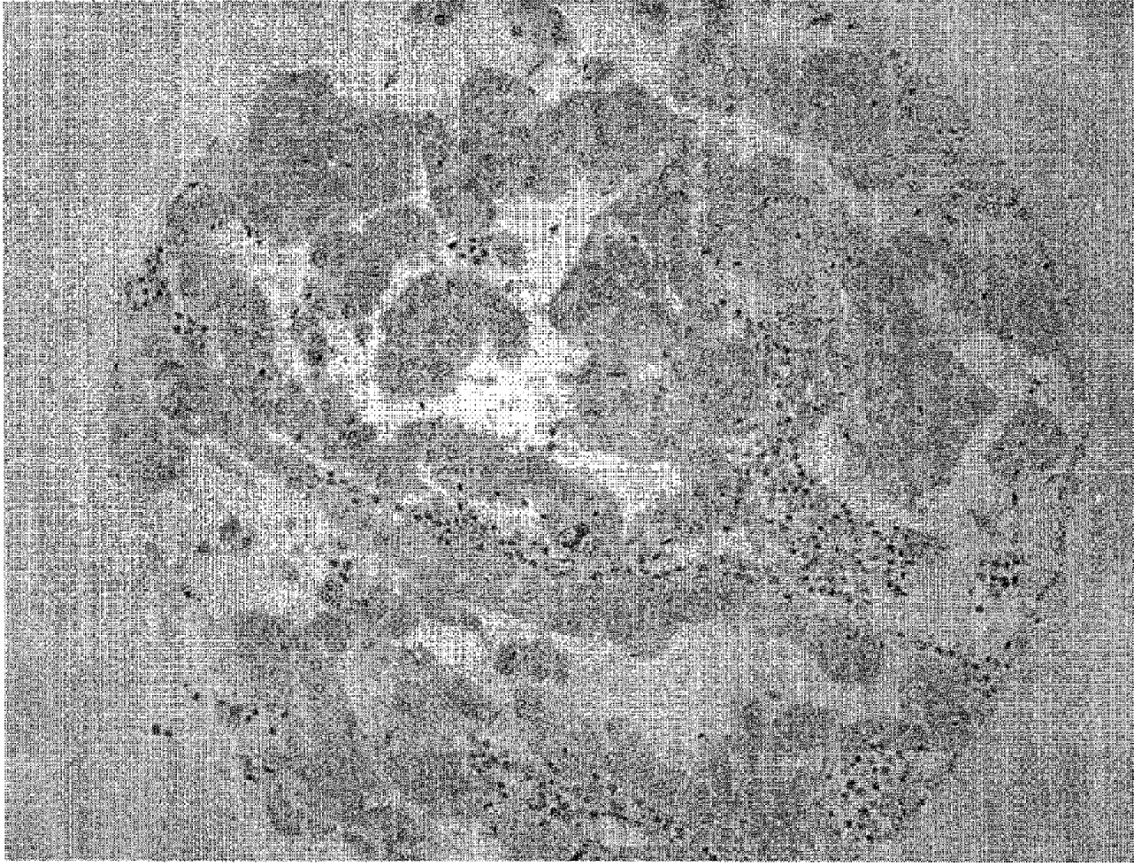
**FIGURA 3E**





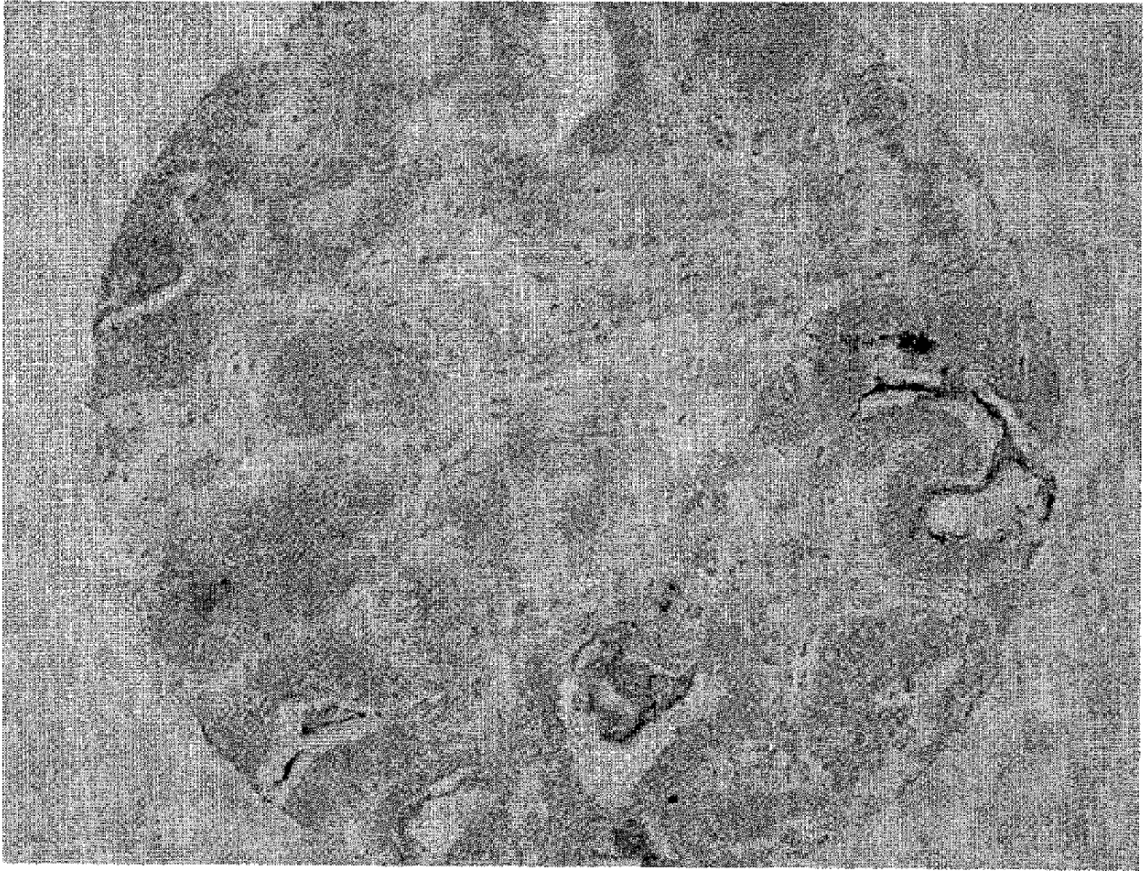
**FIGURA 3F**





**FIGURA 3G**





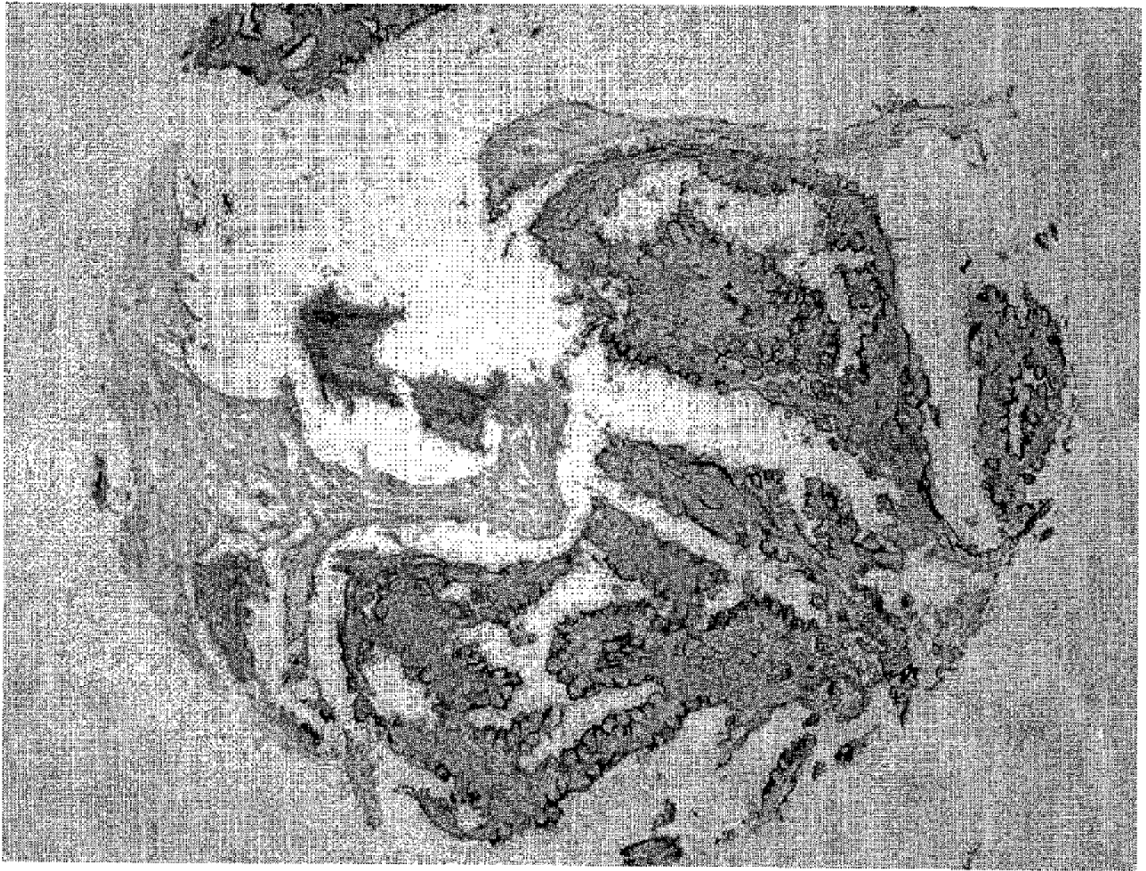
**FIGURA 3H**





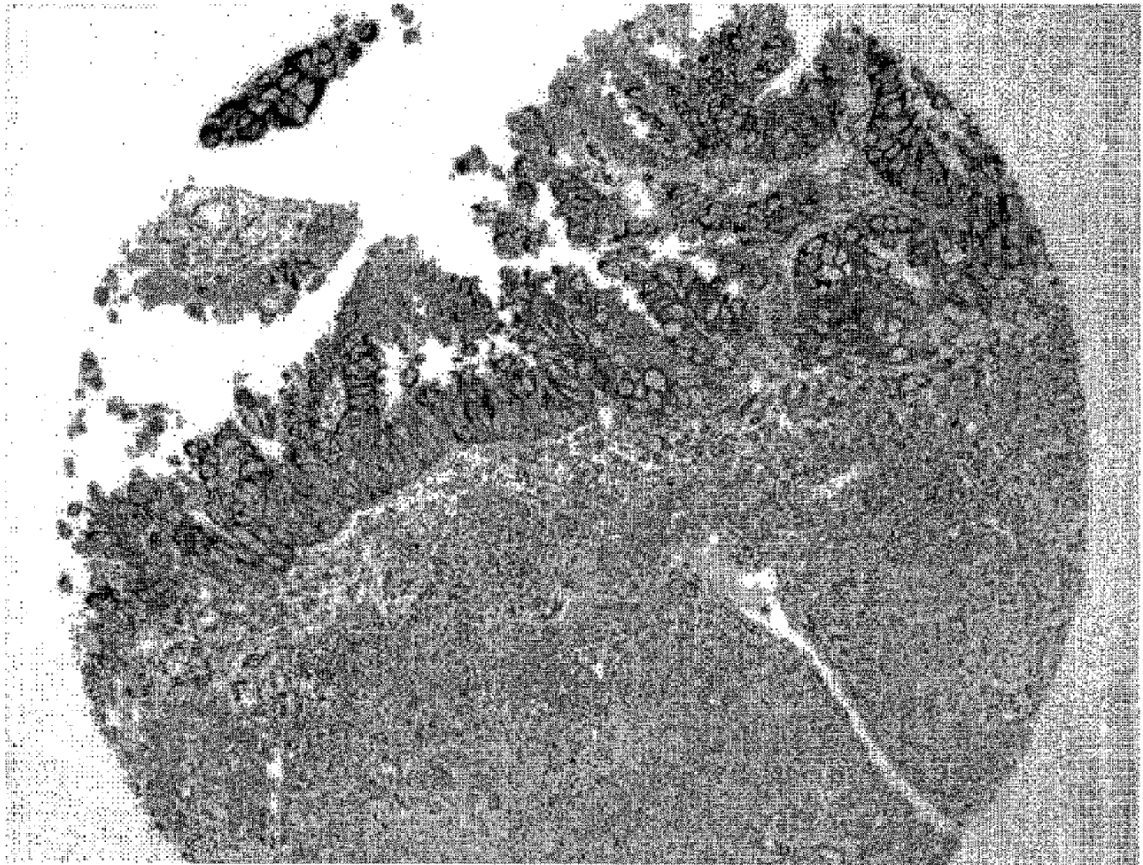
**FIGURA 3I**





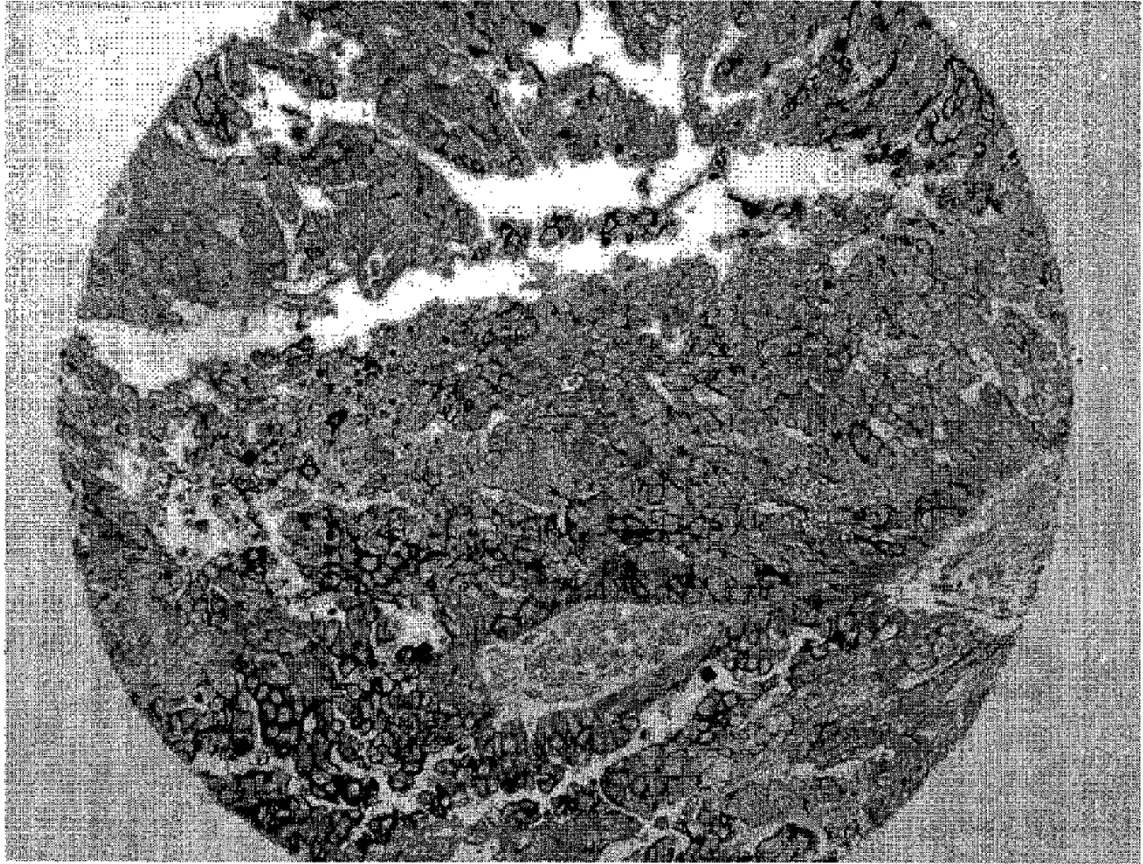
**FIGURA 3J**



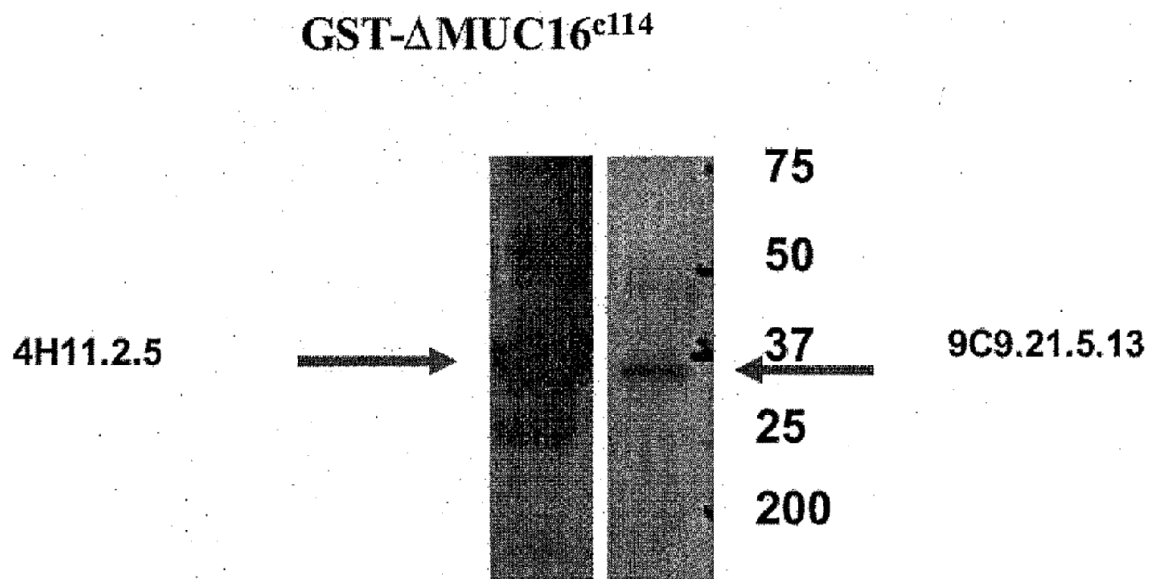


**FIGURA 3K**





**FIGURA 3L**



**FIGURA 4A**

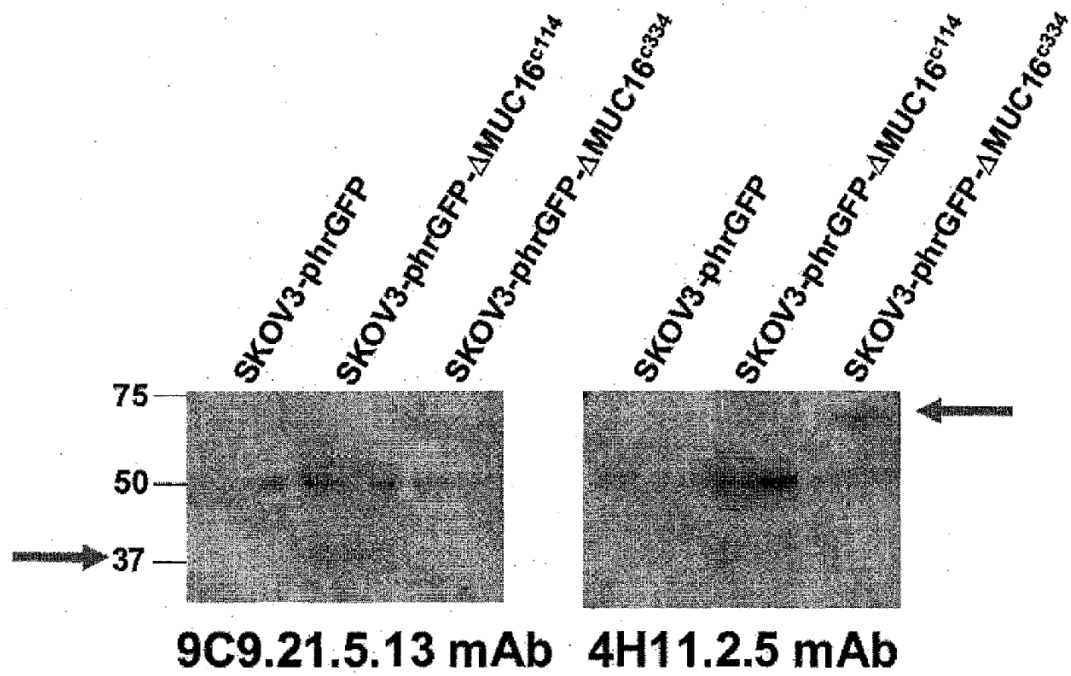
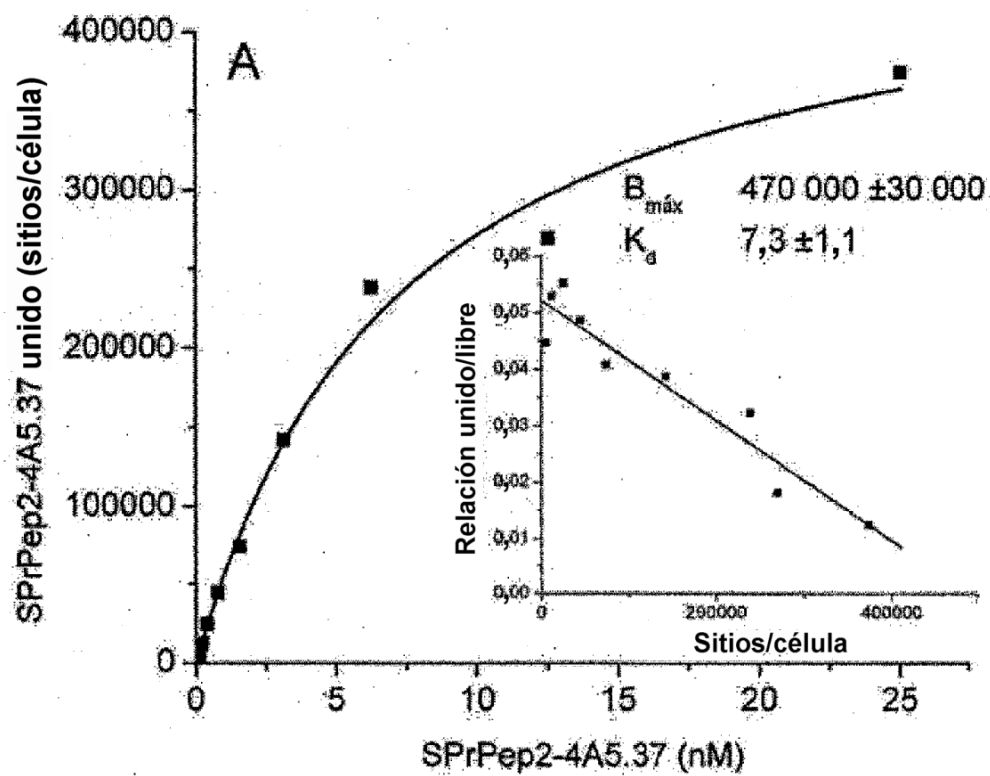
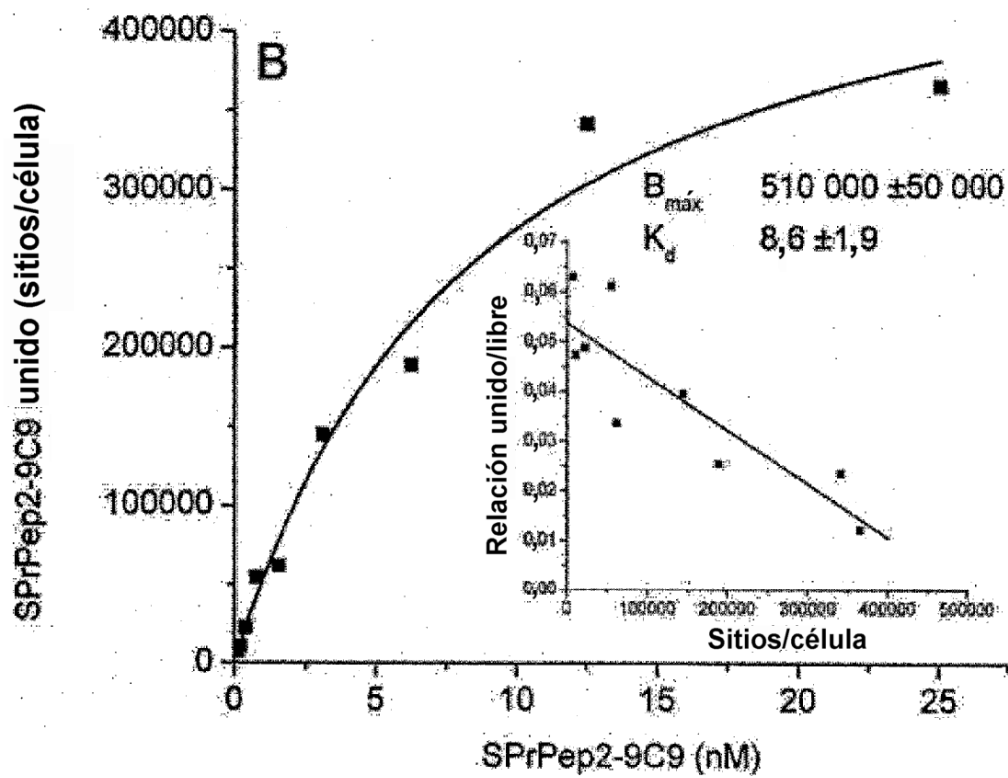


FIGURA 4B

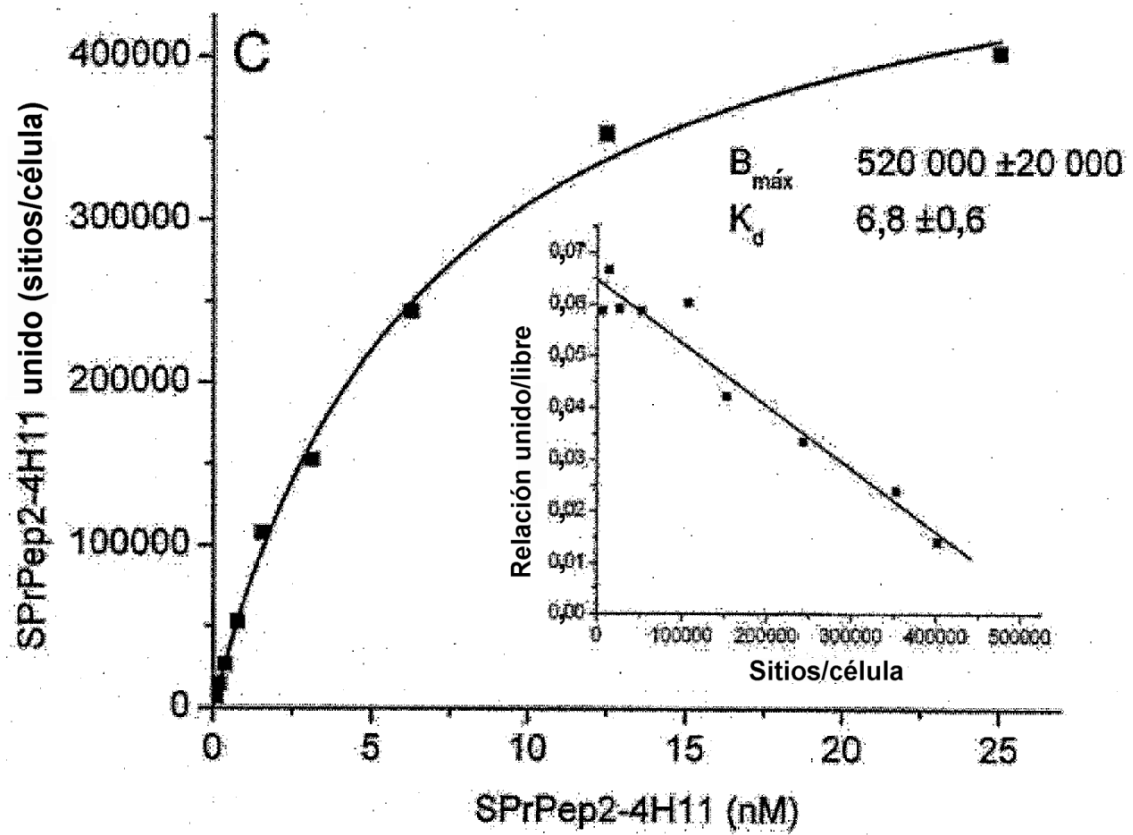




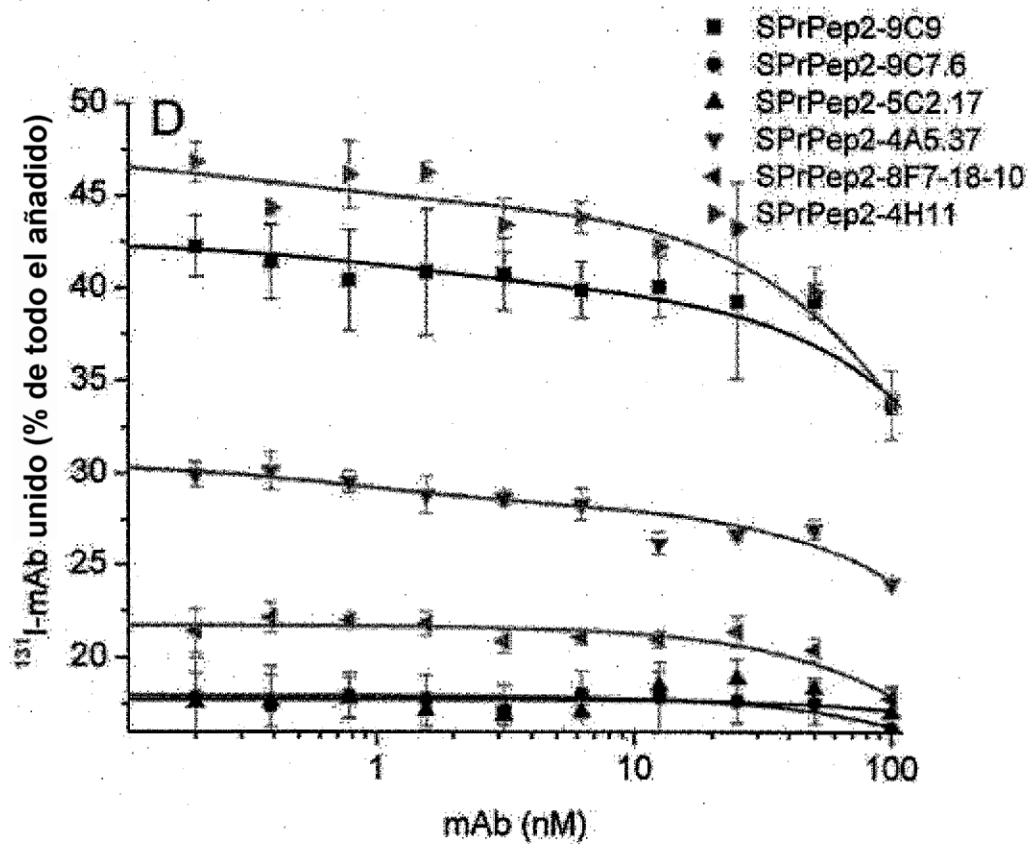
**FIGURA 5A, PANEL A**



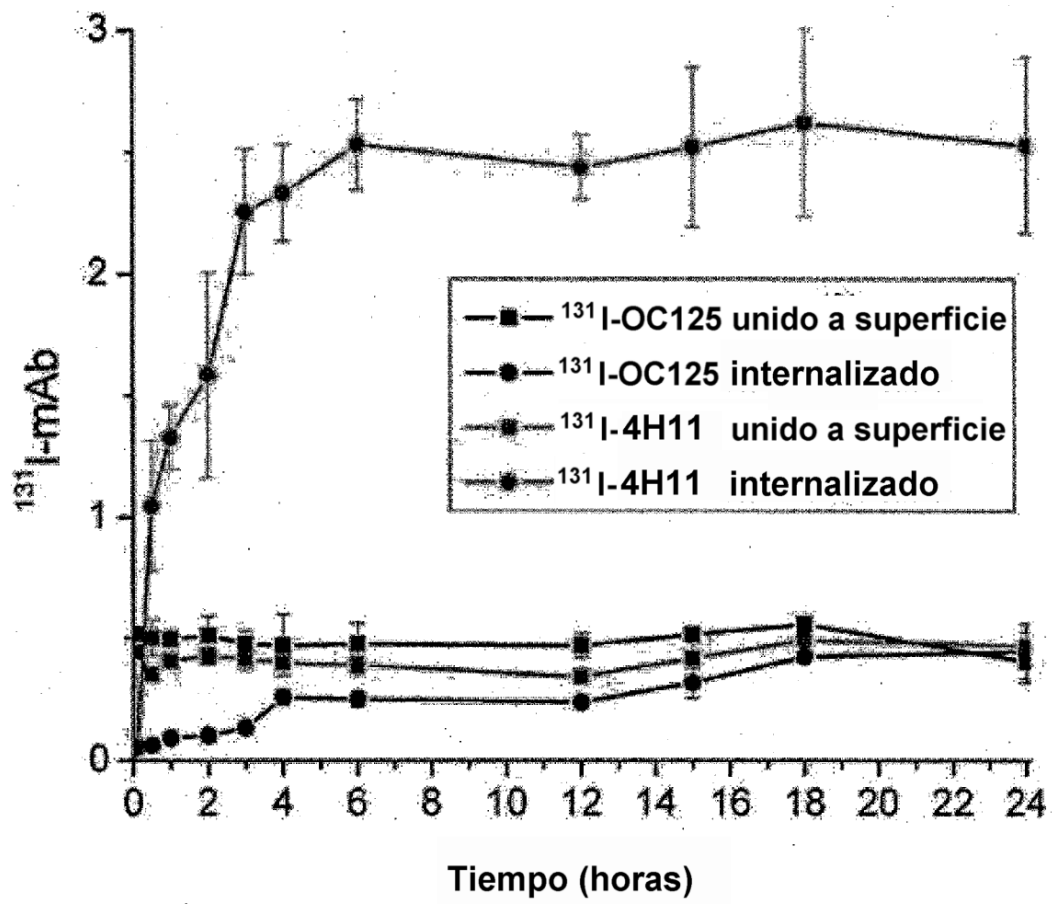
**FIGURA 5A, PANEL B**



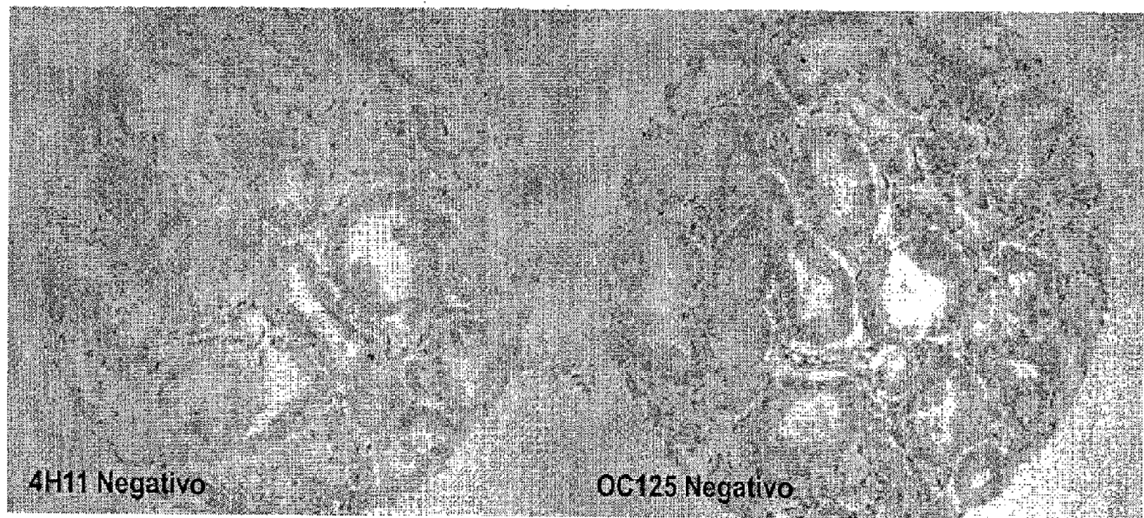
**FIGURA 5A, PANEL C**



**FIGURA 5A, PANEL D**

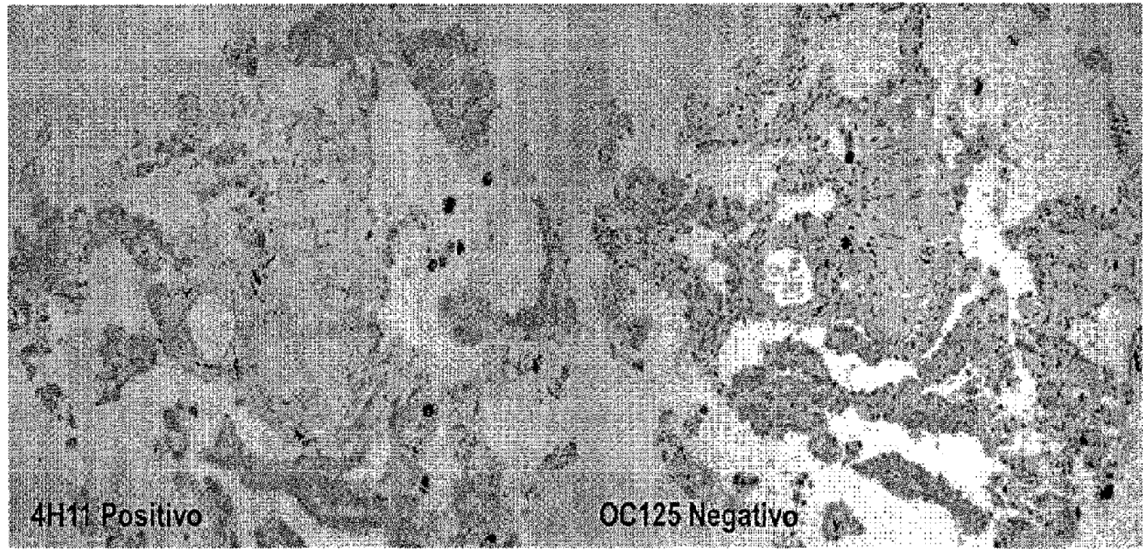


**FIGURA 5B**

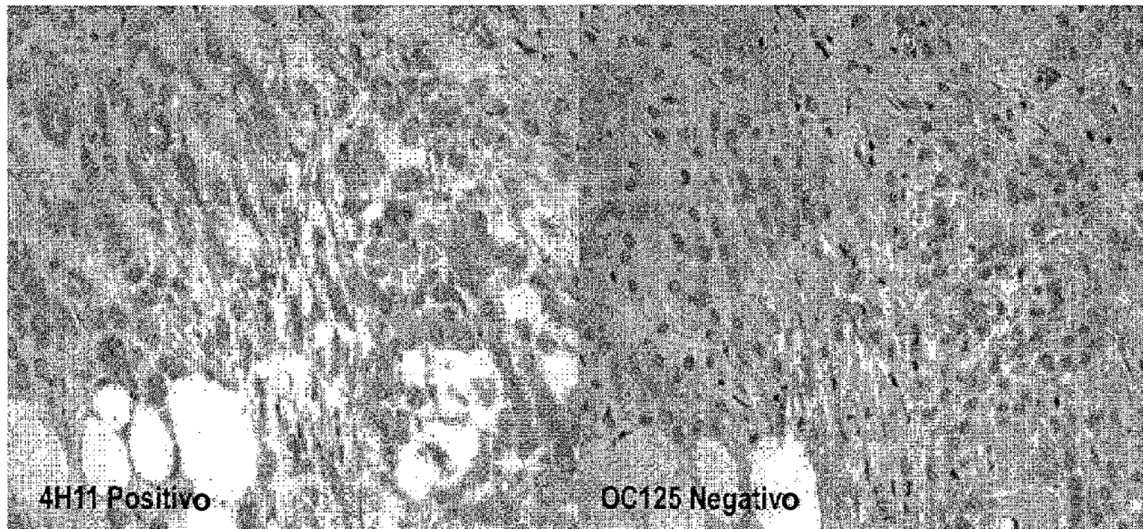


**FIGURA 6A**



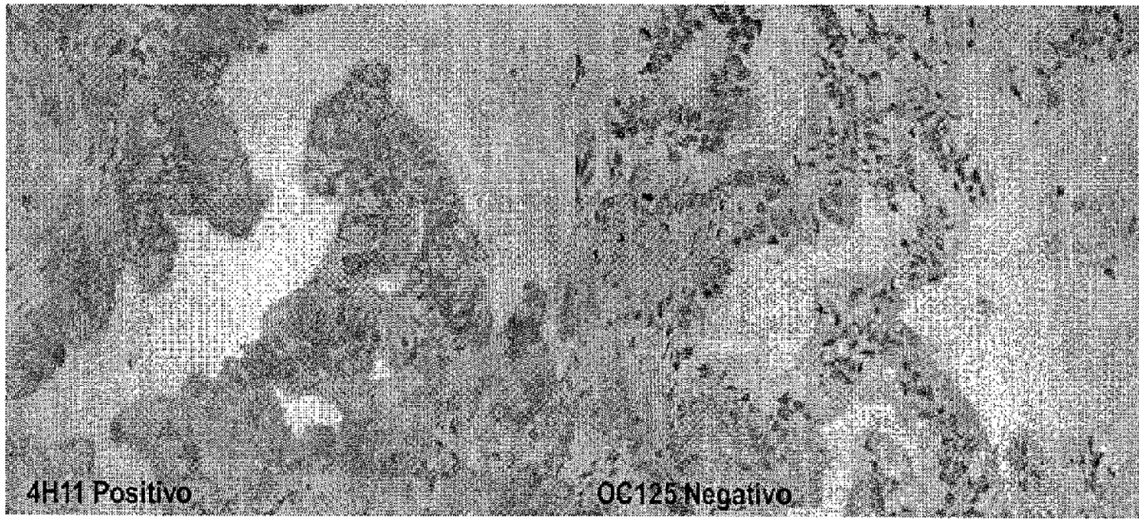


**FIGURA 6B**



**FIGURA 6C**





**FIGURA 6D**

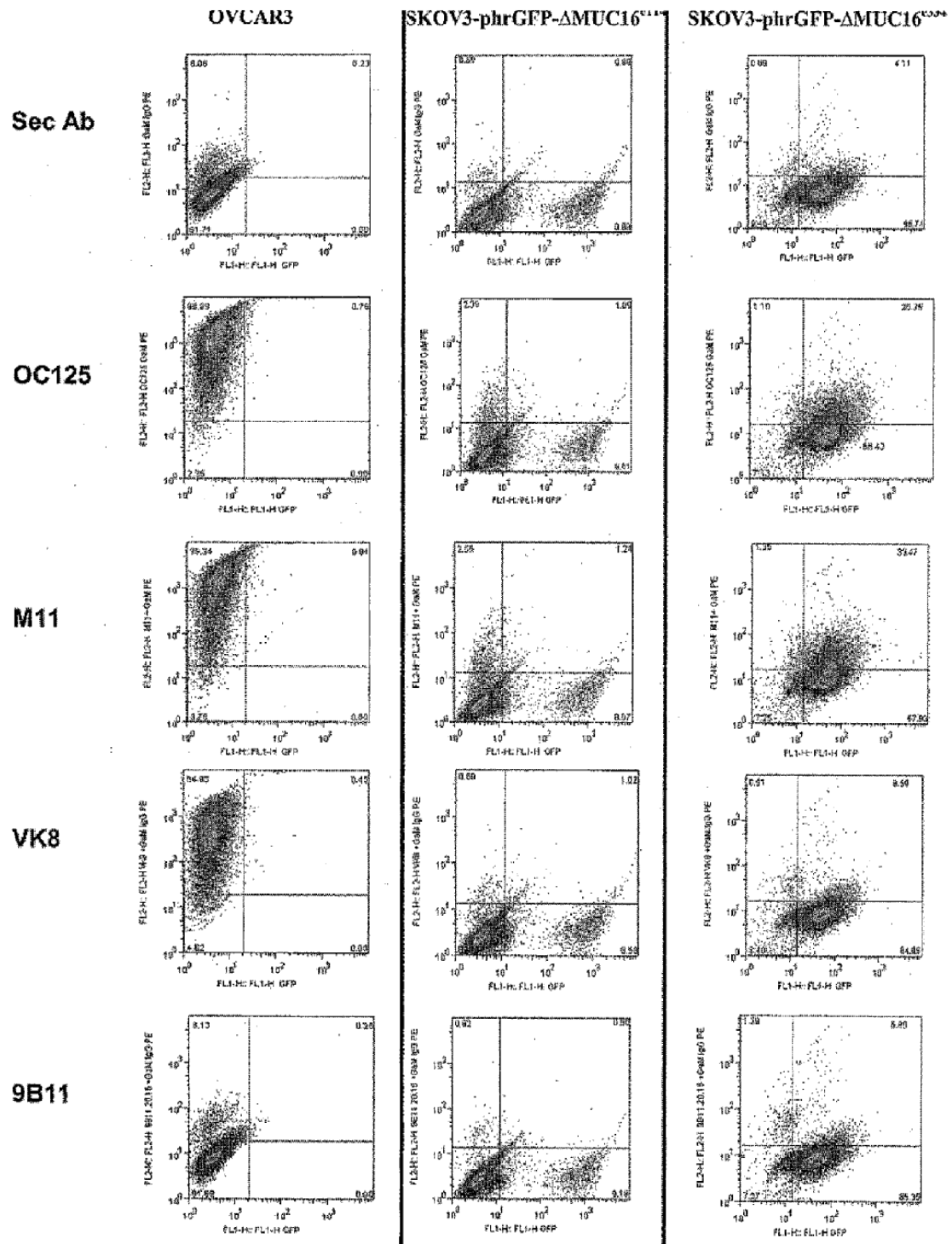


FIGURA 7, PÁGINA 1 DE 2

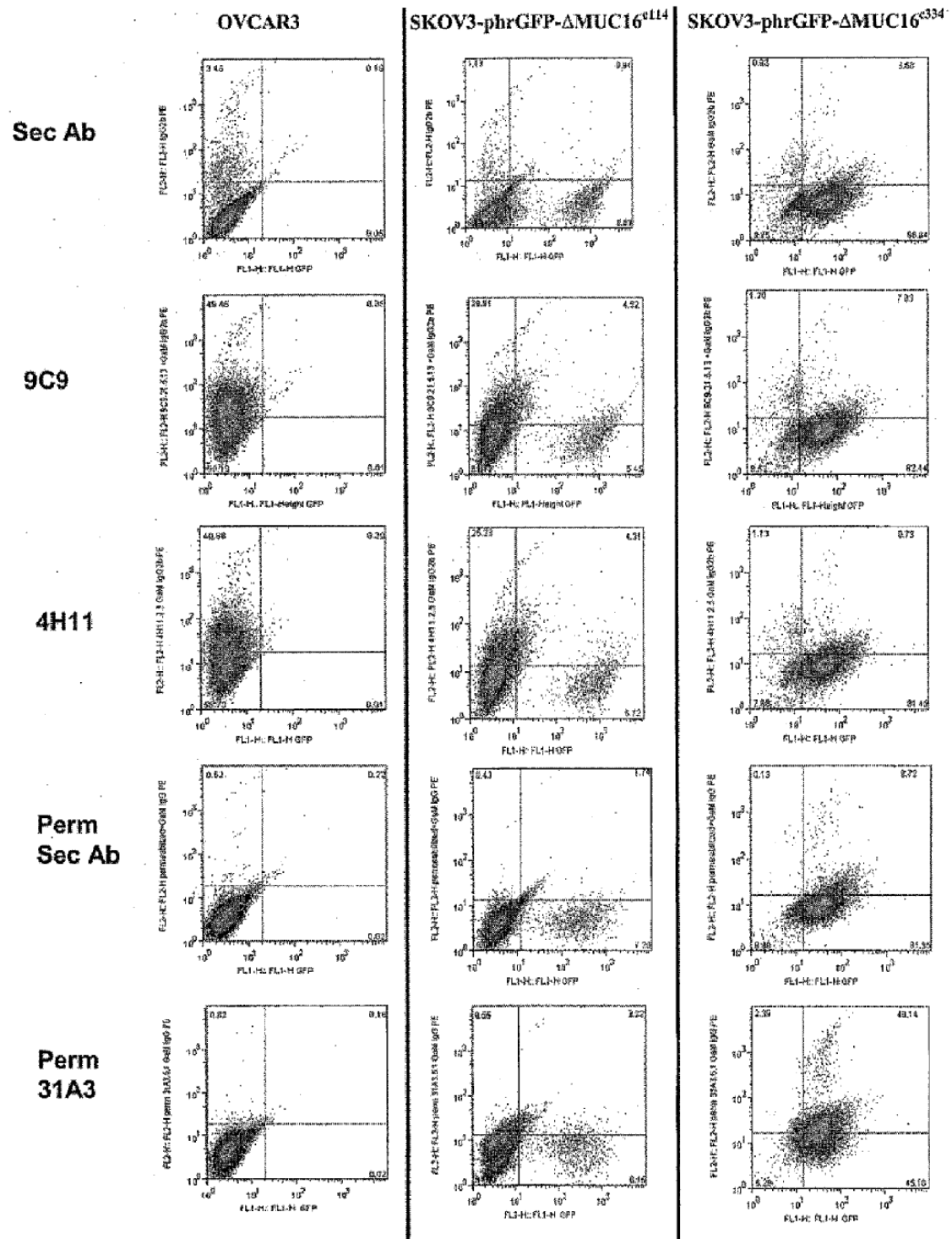


FIGURA 7, PÁGINA 2 DE 2



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

gtgaagctggaggagtcagggggaggcttcgtgaagcctggagggtccctcaaaatctcctgtgcagcctctggattcac  
tttcagaaactatgccatgtcctgggttcgcctgagtcgggagatgaggctggagtggtcgcaaccattagcagtgctg  
gtggttacatcttctattctgacagtggtgcagggacgattcaccatttccagagacaatgccaagaacacctccacttg  
caaatgggcagtcctgaggtctggggacacggccatgtattactgtgcaaggcagggtatttggttaactacggtgattacta  
tgctatggactactggggccaagggaccacgggtcacctctcctca

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

gacattgagctcaccagtcctccatcctccctgggtgtgtcagcaggagagaagggtcactatgagctgcaaaccagtc  
gagtcgtctcaacagtagaaccgaaagaaccagttggcttggtaccagcaaaaaaccaggacagtcctcctgaactgctga  
tctactgggcatccactcggcaatctgggtccctgatcgcttcacaggcagtggtctgggacagatttactctcacc  
atcagcagtggtcagggtgaagacctggcagtttattactgccagcaatcttataatctactcacgttcggtcctggggac  
caagctggagatcaaacgg

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

gtgaagctgcaggagtcagggggaggcttcgtgaagcctggagggtccctcaaagtctcctgtgcagcctctggattcac  
tttcagtagctatgccatgtcctgggttcgcctgagtcgggagatgaggctggagtggtcgcaaccattagcagtgctg  
gtggttacatcttctattctgacagtggtgcagggacgattcaccatttccagagacaatgccaagaacacctgcacctg  
caaatgggcagtcctgaggtctggggacacggccatgtattactgtgcaaggcagggtatttggttaactacggtgattacta  
tgctatggactactggggccaagggaccacgggtcacctctcctca

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

gacattgagctcaccagtcctccatcctccctgggtgtgtcagcaggagagaagggtcactatgagctgcaaaccagtc  
gagtcgtctcaacagtagaaccgaaagaaccagttggcttggtaccagcaaaaaaccaggacagtcctcctgaactgctga  
tctactgggcatccactaggcaatctggagtcctgatcgcttcacaggcagtggtctgggacagatttactctcacc  
atcagcagtggtcagggtgaagacctggcagtttattactgccagcaatcttataatctactcacgttcggtcctggggac  
caagctggaggtcaaacgg

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

gtgaagctggaggagtcagggggagacttggtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagtcctctggattcac  
tttcagtagccattccatgtcttggttcgtcagactccagagaagaggctagagtggtcgcatccgtgagtagtggtg  
gtaggatctactattcggacagtggtgaagggccgattcaccgtcaccagagaaaatgacaggaacacctgtatttggtta  
atgagtagtctgaggtctgaggacacggccatgtattattgtggaaggagacaggtattttatgctttggacaattgggg  
ccaagggaccacgggtcacctctcctca

(F) 9B11 VL.A (SEQ ID NO:09)

gacattgagctcaccagtcctccatcctccctgggtgtgtcagcaggagagaagggtcactatgagctgcaaaccagtc  
gagtcgtctcaacagtagaaccgaaagaaccagttggcttggtaccagcaaaaaaccaggacagtcctcctgaactgctga  
tctactgggcatccactaggcaatctggagtcctgatcgcttcacaggcagtggtctgggacagatttactctcacc  
atcagcagtggtcagggtgaagacctggcagtttattactgccagcaatcttataatctactcacgttcggtcctggggac  
caagctggaggtcaaacgg

(G) 9B11 VL.B (SEQ ID NO:10)

gacattgagctcaccagtcctcaaagctcctgatctacaaggtttccaaccgattttctgggggtccagacaggttcag  
tggcagtggtcaggggacagatttcacactcaagatcagcagagtgagggtgaggatctgggagtttattactgctttc  
aaggttcacatgttcogtggacgttcggtggaggggaccaagctggagatcaaacgg

FIGURA 8 (1 de 2)

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

GAGGTGAAGCTGGAGGAGTCAGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTA  
CTCATTCTACTGGCTACTTTATGAACTGGGTGAAGCAGACCCATGGAAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTT  
ACAATGGTGCTACTTTCTACAATCAGAAGTTACAGGGCAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCTACCACAGCCCAC  
ATGGAGCTCCTGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGGAAAGGGGAATTACTACGGCCCCTTTGATTA  
CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

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

GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGAAGAAACCATTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAA  
GAGCATTAGCAAATATTTAGCCTGGTATCAAAAGAAACCTGGGAAAATAATAAGCTTCTTATCTACTCTGGATCCACTT  
TGCAATCTGGAATCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCT  
GAAGATTTTGCAATCTATTACTGTCAACAGCATAATGAATACCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAA  
ACGGGCGGCCGCA

**FIGURA 8 (2 de 2)**

(A) MUCINA-16 de *Homo sapiens* (GenBank NP\_078 966) (SEQ ID NO:13)

```

1  mlkpsglpgs  ssptrslmtg  srstkatpem  dsgrtgatls  pktstgaivv  tehtlpfts
61  dktlasptss  vvgrrttqslg  vmssalpest  srgmthsegr  tspslspqvn  gtpsrnypa
121 smvsglsspr  trtsstegnf  tkeastytlt  vettsgpvte  kytvptetst  tegdstetp
181 dtryipvkit  spmktfadst  askenapvsm  tpaettvtds  htpgrtnpsf  gtlyssfld
241 spkgtpnsrg  etslelilst  tgypfsspep  gsaghsrist  saplssasv  ldnkisets
301 fsgqsltspl  spgvpearas  tmpnsaifps  mtlsnaetsa  ervrstissl  gtpsistkq
361 aetiltfhaf  aetmdipsth  iaktlasewl  gspgtlpgts  tsalsttsp  ttlvseetn
421 hhstsgkete  gtlntsmtp  etsapgeese  mtatlvp  ftldskirs  psqvssshp
481 relrttgsts  grqssstaah  gssdilratt  sstskasswt  sestaqqfse  pqhtqvwet
541 psmkterppa  stsvaapitt  svpsvsgft  tlktsstkgi  wleetsadtl  igestagpt
601 hqfavptgis  mtggsstrgs  qgtthlltra  tassetsadl  tlatngvpvs  vspavskta
661 gssppggtkp  sytmvssvip  etsslqssaf  regtslgltp  lntrhpfssp  epdsaghtk
721 stsipllssa  svledkvsat  stfshhkats  sittgtpeis  tktkpssavl  ssmtlsnaa
781 spervrnats  plthpspsge  etagsvltls  tsaettdspn  ihptgtltse  ssespstls
841 psvsgvkttf  ssstpsthl  tsgeeteets  npsvsqpets  vsrvrttlas  tsvptpvfp
901 mdtwptrsaq  fssshlvsel  ratsstsvtn  stgsalpkis  hltgtatmsq  tnrdtfnds
961 apqsttwpet  sprfktglps  atttvtsat  slsatvmvsk  ftspatssme  atsirepst
1021 ilttettnp  gsmavastni  pigkgyiteg  rldtshlpig  ttassetsmd  ftmakesvs
1081 svspsqmda  agsetpgrts  qfvdttfddv  yhltsreiti  prdgtssalt  pqmtathpp
1141 pdpgsarstw  lgilssspss  ptpkvtsmst  fstqrvttsm  imdtvetsrw  nmpnlpstt
1201 ltpsniptsg  aigkstlvpl  dtspatsle  asegglptls  typestntps  ihlgahass
1261 spstikltma  svvkpgsytp  ltfpsiethi  hvstarmays  sgsspentap  getntgstw
1321 pttiytttdp  kdtssaqvst  phsvrtlrtt  enhpktesat  paaysgspki  ssspnltsp
1381 tkawtitdtt  ehstqlhytk  laekssgfet  qsapgpvs  iptspdigss  tleltsdvp
1441 eplvlapseq  ttitlpmatw  lstslteema  stdldissps  spmstfaifp  pmstpshe
1501 kseadtsair  ntdsttdqh  lgirslgrtg  dlttvpitpl  tttwtsvieh  stqaqdtls
1561 tmspthvtqs  lkdqtsipas  asphlteve  pelgtqgrss  seattfwkps  tdtlsreie
1621 gptniqstpp  mdntttgsss  sgvtlgiahl  pigtsspaet  stnmalerrs  statvsmag
1681 mgllvtsapg  rsisqslgrv  ssvlseste  gvtdsskgs  prlntqgnta  lsslepsy
1741 egsmstsip  ltsspttpdv  efiggstfw  kevttvmtsd  iskssartes  ssatlmsta
1801 gstentgkek  lrtasmdlps  ptpsmevtpw  isltlsnapn  ttdsldlshg  vhtssagtl
1861 tdrslntgvt  rasrlengsd  tsskslsmgn  sthtsmtyte  ksevsassi  hpetsapga
1921 ttltstpgnr  aisltlpfss  ipveevistg  itsgpdinsa  pmthspitpp  tivwtstgt
1981 eqstqplhav  ssekvsvtq  stpyvnsvav  saspthensv  ssgsstsspy  ssaslesld
2041 tisrrnait  wlwdlttslp  tttwpstsl  ealssghsgv  snpssttfe  plfsaasts
2101 akqrnpetet  hgpqntaast  lntdassvtg  lsetpvgasi  ssevpplmai  tsrsdvsgl
2161 sestanpslg  tassagtklt  rtislptses  lvsfrmnkdp  wtvsiplgsh  pttntetsi
2221 vnsagppgl  tvasdvidtp  sdgaesiptv  sfspspdtev  ttishfpekt  thsfrtiss
2281 theltsrvtp  ipgdwmssam  stkptgasps  itlgerrrit  saapttspiv  ltasftets
2341 vsldnettk  tsdildarkt  nelpsdssss  sdlintsias  stmdvktas  isptsisgm
2401 asspslffs  drpqvptstt  etntatpsv  ssntysldg  snvggtpstl  ppftithpv
2461 tssallawsr  pvrtfstmv  tdtasgenpt  ssnsvvtsvp  apgtwtsvgs  ttdlpamgf
2521 ktspageahs  llastiepat  aftphlsaav  vtgssatsea  slttteska  ihsspqtp

```

FIGURA 9 (página 1 de 6)

2581 ptsganwets atpesllvvt etsdttltsk ilvtdtilfs tvstppskfp stgtlsgas  
 2641 ptllpdtpai pltateptss latsfdstpl vtiasdslgt vpettltmse tsngdalvl  
 2701 tvsnpdrsip gitiggvtes plhpsstsp kivaprntty eggsitvalst lpagttgsl  
 2761 fsqssenset talvdssagl erasvmltt gsqgmassgg irsgsthstg tktfssslpl  
 2821 mnpgevtams eittnrltat qstapkgipv kptsaesgll tpvsasssps kafasltta  
 2881 ptwgipqstl tfefsevpsl dtksaslptp gqslntipds dastassslls kspeknpra  
 2941 mmtstkaisa ssfqstgfte tpegsaspsm agheprvpts gtgdpryase smsypdpks  
 3001 ssamtstsla sklttlfstg qaarsgssss pislsteket sflsptasts rktslflgp  
 3061 marqpnihvh lqtsaltlsp tstlnmsqee ppeltssqti aeeegttaet qtlftfpse  
 3121 ptllpvssp teptarrkss petwassiv paktslvett dgltvttikm ssqaaggs  
 3181 wpapaeetgs spagtspgsp emsttlkims skepsispei rstvrnspwk tpettvpme  
 3241 tvepvtlqst algsstsis hlptgttspt ksptenmlat ervslspsp eawtnlysg  
 3301 pggtrqslat mssvslespt arsitgtgqq sspelvshtt gmefsmwhgs tgggtgdt  
 3361 slstssnile dpvtspnsvs sltdkskhkt etwvsttaip stvlennkima aeqqtsrsv  
 3421 eaysstssws dqtsgsditl gaspdvntnl yitstaqtts lvslpsgdgg itsltnpsg  
 3481 ktssassvts psigletlra nvsavksdia ptaghlsqts spaevsildv ttaptpgis  
 3541 tittmgtnsi stttnpevg mstmtdstpat errttstehp stwsstaasd swtvtmdts  
 3601 lkvarspgti stmhttsfla ssteldsmst phgritvigt slvtpssdas avktetsts  
 3661 rtlspsdtta stpistfsrv qrmsisvpdi lstswtpsst eaedvpvsmv stdhastkt  
 3721 pntplstflf dslstldwdt grslssatat tsapqgattp qeltletmis patsqlpfs  
 3781 ghitsavtpa amarssgvtf srpdtskka egtstqlptt tsahpgqvpr saattldvi  
 3841 htaktptatf qrqqgtaltt earatsdsw ekekstpsap witemmnsvs edtikevts  
 3901 ssvlrtlnti dinlesgtts spswksspye riapsesttd keaihpstnt vettgwvts  
 3961 ehashstipa hsasskltp vvtststrega ivsmstttwp estrartepn sfltielrd  
 4021 spymdtsst qtsiisspgs taitkgprte itsskriess flaqsmrssd spseaitrl  
 4081 nfpamtesgg milamqtspp gatslsaptl dtsataswtg tplatqgrft ysekttlfs  
 4141 gpedtsqpsp psveetssss slvpiahatts psnilltsqg hpsstppvt svflsetsg  
 4201 gktttdmsris lepgtslppn lsstageals tyeasrdtka ihhsadtavt nmeatssey  
 4261 pipghtkpsk atsplvtshi mgditsstsv fgssetteie tvssvnqglq erstsqvas  
 4321 atetstvith vssgdatthv tktqatfssg tsissphqfi tstntftdvs tnpstslim  
 4381 essgvttittq tgptgaatgg pylltdstmp yltetplavt pdfmqsekt liskgpkdv  
 4441 wtspssvaet sypssltpl vttippatst lggqhtssp satsvltsgl vktttdmlnt  
 4501 mepvtnsppn lnnpsneila tlaattdiet ihpsinkavt nmgtassahv lhstlpvss  
 4561 pstatspmvp assmgd alas isipgsettd iegeptsslt agrkenstlq emnsttesn  
 4621 ilsnvsvgai teatkmevps fdatfiptpa qstkfpdifs vassrlsnsp pmtisthmt  
 4681 tqtgssgats kiplaltdst letsagtpsv vtegfahski ttamnndvkd vsqtnppfq  
 4741 easspssqap vlvttlpssv aftpgwhsts spvsmssvlt sslvktagkv dtsletvts  
 4801 pqsmstltd isvtsaattd ietthpsint vvtnvgttgs afeshstvs ypepskvts  
 4861 nvtstmedt tisrsipkss ktrtetett ssltpklret sisqeitsst etstvpyke  
 4921 tgattevsrt dvtsssstsf pgpdqstvs distetntrl stspimtesa eitittqtg  
 4981 hgatsqdtft mdpsnttpqa gihsamthgf sqldvttlms ripqdvswts ppsvdkts  
 5041 ssflsspamt tpslisstlp edklsspmts lltsglvkit dilrtrlepv tsslpnfss  
 5101 sdkilatskd skdtkeifps inteetnvka nnsgheshsp aladsetpka ttqmvtitt  
 5161 gdpapstsmv vhgsssettni kreptyfltp rlretstsge ssfptdtsfl lskvptgti

FIGURA 9 (página 2 de 6)



5221 evsstgvnss skistpdhdk stvppdtftg eiprvftssi ktksaemtitt tqasppesa  
 5281 hstlpldtst tlsqggthst vtqgfpvsev ttllmgmgpgn vswmttppve etssvsslm  
 5341 spamtspspv sstspqsips splpvtaip svlvtttdvl gttspesvts sppnlssit  
 5401 erpatykda hteaamhhst ntavtnvgts gsgghksqssv ladsetskat plmsttstl  
 5461 dtsvststpn isqtnqiqte ptaslsprlr esstsektss ttetntafsy vptgaitqa  
 5521 rteissrsts isdlrptia pdistgmitr lftspimtk aemtvtqt tpgatsggi  
 5581 pwdtsttlfq ggthstvsqg fphseittlr srtpgdvswm ttpvveetss gflmspsm  
 5641 spspvsstsp esipssplpv talltsvlvt ttnvlgttsp epvtssppnl ssptqerlt  
 5701 ykdahteam hasmhtntav anvgtsisgh esqssvpads htskatspmg itfamgds  
 5761 ststpaffet riqtestssl ipglrdtrts eeintvtets tvlsevpttt ttevsrtev  
 5821 tssrttisgp dhskmspyis tetitrlstf pfvtgstema itnqtgpgit isqatltld  
 5881 sstaswegth spvtgrfphs eettmtsrst kgvswqspps veetsspsp vpplaitsh  
 5941 slysavsgss ptsalpvtsl ltsgrrrktid mldthselvt ssllpsassfs geiltseas  
 6001 ntetihfsen taetnmgttn smhklhssvs ihsqpsgthp pkvtgsmmed aivststpg  
 6061 petknvdrds tspltpelke dstalvmnst tesntvfssv sldaatevsr aevtyydp  
 6121 mpasaqstks pdispeasss hnsppltis thktiatqtg psgvtslgql tldtstiat  
 6181 agtpsartqd fvdsettsvm nndlndvltk spfsaeans lssqapllvt tpspvtst  
 6241 gehstsslv vtsvptptla kitdmtnle pvtrspqnlr nlatseatt dthtmhpsi  
 6301 tavanvgts spnefyftvs pdsdpkats avvitstsgd sivstsmpr samkkiese  
 6361 tflslfrlre tstsqkigss sdtstvfka ftaattevsr teltsssrts iggtektm  
 6421 pdtstrsvtm lstfagltks eertiatqtg phratsqgtl twdtsittsq agthsamth  
 6481 fsqldlstlt srvepyisgt sppsvektss sssllslpai tpspvpptl pesrpspv  
 6541 ltslptsglv kttmblasva slppnlgst hkipttsedi kdekmypt niavtnvg  
 6601 tsekesyssv payseppkv spmvtstfnir dtivstsmg sseitrieme stfslahgl  
 6661 gtstsqdpiv steksavlhk lttgatetsr tevassrrts ipgpdhstes pdistevip  
 6721 lpislgites snmtiitrtg pplgstsggt ftldtpttss ragthsmatq efphsemtt  
 6781 mnkdpeilsw tippsieks fssslmpspa mtsppvsstl pkihttpsp mtslltpsl  
 6841 mtttdltgts epttssppnl sstsheilt dedttaeam hpststaant vettssghg  
 6901 qssvladsek tkatapmdt stmghttvt ssmvssettk ikrestyslt pglretsia  
 6961 nasfstdtst vlsevpgtt aevsrtevt sgrrsipgs qstvlpeist rtmtrlfas  
 7021 tmtesaemti ptqtgpgst sqdtltldts tksqakths tltqrfphse mtlmsrgp  
 7081 dmwqsspsl enpslpsll slpattspvp isstlpvtis ssplpvtsll tsspvtttd  
 7141 lhtspelvt sppklshtsd erlttgkdt nteavhpstn taasnveips sghepsa  
 7201 adsetskats pmfitstqed ttvaistphf letsriqkes isslsplkre tgssvetss  
 7261 ietavlse sigatteisr tevtsssrts isgsaestml peisttrkii kfptspila  
 7321 ssemtiktqt sppgstsest ftldtsttps lvithstmtg rlpheittl vsrgagdvp  
 7381 psslpveets pssqlslsa mispspsst lpasshssa svtslltpgk vkttevlada  
 7441 aepetsspps lsstsveila tsevttdtek ihpfsntav kvgtsssghe spssvlpds  
 7501 ttkatsamgt isimgdtsv tltpalntr kiqsepassl ttrlretsts eetlatea  
 7561 tvlskvstga ttevsrteai sfertsmsgp eqstmsqdis igtiprisas svltesakm  
 7621 ittqtgptes tlestlnlnt attpswveth siviqgfphp emttsmgrgp ggvswwpspp  
 7681 vketsppssp lsipavtsph pvsttflahi ppsplpvtsl ltsgpatttd ilgtstepg  
 7741 sssslstts herlttykdt ahteavhpst ntggtnvatt ssgyksqssv ladsspmct  
 7801 stmgdtsvlt stpafletrr iqtelasslt pglressgse gtssgkmt vlskvptga

FIGURA 9 (página 3 de 6)



```

7861 teiskedvts ipgpaqstis pdistrtrvsw fstspvmtes aeitmnhths plgattqgt
7921 tldtssttsl tmthstisqg fshsqmstlm rrgpedvswm sppllektrp sfslmsspa
7981 tpspsvsstl pesissplp vtslltsgla kttmdlhkss epvtnspanl sstsveila
8041 sevttdtekt hpssnrtvtd vgtsssghes tsfvladsqt skvtspmvit stmedtsvs
8101 stpgffetsr iqteptsslt lglrktsse gtslatemst vlsqvptgat aevsrtev
8161 ssrtsisgfa qltvspetst etitrlptss imtesaemmi ktqtdppgst pesthtvdi
8221 ttpnwveths tvtqrfrshse mttlvsrspg dmlwpsqssv eetssassll slpattspg
8281 vsstlvedfp saslpvtsll npglvittdr mgisrepqts stsnlsstsh erlttledt
8341 dtedmqpsth tavtnvrtsi sgheqssvl sdsetpkats pmgttytme tsvsistsd
8401 fetsriqiep tssltsglre tssserissa tegstvlsev psgattevsr tevissrgt
8461 msgpdqftis pdisteaitr lstspimtes aesaitietg spgatsegtl tldtstttf
8521 sgthstaspg fshsemttlm srtpgdvpwp slpsveeass vssslsspaam tstsffstl
8581 esissphpv talltlgpvk ttdmlrtsse petssppnls stsaecilats evtkdreki
8641 pssntpvvnv gtviykhls ssvladlvt kptspmatts tlgntsvsts tpaftpemmm
8701 qptssltsgl reistsqets satersasls gmpgtgattkv srtealslgr tstpqpas
8761 ispeistet tristplttt gsaemtltk tghsgassqg tftldtssra swpgthsa
8821 hrsphsgmtt pmsrgpedvs wpsrpsvekt sppsslvsls avtspsplys tpsesshss
8881 lrvtslftpv mmkttldmldt slepvttspp smnitsdesl atskatmete aiqlsenta
8941 tqmgtsiarq efyssypglp epskvtspvv tsstikdivs ttipasseit riemestst
9001 tptpretsts qeihsatkps tvpykaltsa tiedsm tqvm sssrgpspdq stmsqdist
9061 vitrlstspi ktestemtit tqtgspgats rgtltldtst tfmsgthsta sqgfshsqm
9121 almsrtpgdv pwlshpsvee assasfslss pvmtssspvs stlpdsihss slpvtsltl
9181 glvkttellg tssepetsp pnlssstaei laitevtdt eklemtnvvt sgythesps
9241 vladsvttka tssmgitypt gdnvltstp afsdtsriqt ksklsltpgl metsiseet
9301 satekstvl svptgattev srteaissr tsipgpaqst mssdtsmeti tristpltr
9361 estdmaitpk tgpsgatsqg tftldsssta swpgthsatt qrfpqsvvtt pmsrgpedv
9421 wpsplsvekn sppsslvsss svtspsplys tpsgsshssp vpvtslftsi mmkatdml
9481 slepettsap nmnitsdesl aaskattete aihvfentaa shvettsate elyssspgf
9541 eptkvispvv tsssiirdnmv sttmppgssgi trieiesmss ltpglretrt sqditsste
9601 stvlykmpsg atpevsrtev mpsrstsipg paqstmsldi sdevvtrlst spimtesae
9661 tittqtgysl atsqvtlplg tsmtflsgth stmsqglshs emtnlmsrgp eslswtspr
9721 vettrssssl tsplttsls pvsstlldss pssplpvtsl ilpglvktte vldtssepk
9781 ssspnlssts veipatseim tdtekihps ntavakvrt ssvheshssv ladsettitt
9841 psmgitsavd dttvftsnpa fsetrripte ptfsltpgfr etstseetts itetsavly
9901 vptsattevs mteimssnri hipdsdqstm spdiitevit rlssssmmse stgmtittq
9961 sspgataqst ltlatttapl arthstvppr flhsemttlm srspenpswk sslfvektss
10021 sssllslpvt tpspsvsstlp qsipsssfsv tslltpgmvk ttdtstepgt slspnlsgt
10081 veilaasevt tdtekihps smavtnvgtt ssghelyssv sihsepskat ypvgtpsma
10141 etsistsmpa nfettgfeae pfshltsgfr ktnmsldtss vtptntpssp gsthllqssl
10201 tdftssakts spdwpasqy teipvdiitp fnaspsites tgitsfpefr ftmsvtestl
10261 hlstdllpsa etistgtvmp slseamtsfa ttgvpraisg sgspfsrtes gpgdatlst
10321 aeslpsstpv pfssstfttt dsstipalhe itsssatpyr vdtslgtess ttegrlvmv
10381 tldtssqpggr tssspildtr mtesvelgtv tsayqvpsls trlrrtdgim ehitkipne
10441 ahrgtirpvk gpqtstspas pkgltggtk rmettttalk ttttalkts ratltsvvy

```

FIGURA 9 (página 4 de 6)

```

10501 ptlgtltpln asmqmastip temmittpyv fpdvpettss latslgaets talprttpe
10561 fnresettas lvrsrgaers pviqtladvss sepdttaswv ihpaetiptv skttpnffh
10621 eldtvsstat shgadvssai ptnispseld altplvtisg tdtsttfptl tksphetet
10681 ttwlthpaet sstiptipn fshhesdatp siatspgaet ssaipimtv ssgaedlvts
10741 vtssgtdrnm tiptltlspg epktiaslvt hpeaqtssai ptstispavs rlvtsmvt s
10801 aaktsttnra ltnspgepat tvslvthpaq tsptvpwttt iffhsksdtt psmttshga
10861 sssavptptv stevpgvvtv lvtssravis ttipiltlsp gepettpsma tshgeease
10921 iptptvspgv pgvvtslvts sravtsttip iltfslgepe ttpsmatshg teagsavpt
10981 lpevpgmvts lvassravts ttltltslsp gepettpsma tshgaeasst vptvspevp
11041 vvtslvtsss gvnstsiptl ilspgelett psmatshgae assavptptv spgvsgvvt
11101 lvtssravts ttipiltlss sepettpsma tshgveassa vltvspevp mvtslvtss
11161 avtsttiptl tissdepett tsvthseak misaiaptlav sptvgglvts lvtssgset
11221 afsnltvass qpetidswva hpgteassvv ptltvstgep ftnislvt hpaessstlpr
11281 tsrfshseld tmpstvt spe aesssaistt ispgipgvt slvtssgrdi satfptvpe
11341 pheseatasw vthpavtstt vprttptysh sepdttpsia tsgaeatsd fptitvspd
11401 pdmvtsqvts sgt dtsitip tltlssgepe tttstfitye thtssaiptl pvspgaskm
11461 tsvlssgtd sttftptlte tpepettai qlhpaetnt mvprttpkfs hksdttlp
11521 aitspgpeas savstttisp dmsdlvtslv pssgtdtstt fptlsetpye pettatwlt
11581 paetsttvsg tipnfshrgs dtapsmvtsp gvdtrsgvpt ttippispgv vtsqvtsa
11641 dtstaipilt pspgepetta ssathpgtqt gftvpirtvp ssepdtmasw vthppqtst
11701 vsrttssfsh sspdatpvma tsprteassa vlttispgap emvtsqitss gaattstvp
11761 lthspgmpet tallsthprt etsktfpast vfpqvsetta sltirpgaet stalptqtt
11821 slftllvtgt srvdlsptas pgvsaktapl sthpgtetst miptstlslg llettglla
11881 ssaetstst lltvsvpavs glssasittt kpqvtswnt etpsvtsvg ppefsrtvt
11941 ttmtlipse ptpktshge gvspttilrt tmveatnlat tgsptvakt tttfntlag
12001 lftplttpgm stlasesvts rtsynhrswi sttssynrry wtpatstpvt stfsgist
12061 sipssaatv pfmvptlfn titnlqyeed mrhpgsrkfn aterelqgl kplfrnssl
12121 ylysgcrlas lrpekdsat avdaicthrp dpedlgldre rlywelsnlt ngigelgpy
12181 ldrnslyvng fthrssmptt stpgtstvdv gtsptsssp spttagpllm pftlnftit
12241 lgyeedmr rt gsrkfntmes vlqgllkplf kntsvgplys gcrlllrpe kdgaatgvd
12301 icthrl d pks pgl nreqlyw elsklndie elgpytldr n slyvngfthq ssvsttstp
12361 tstvdrlrtsg tpsslspti maagpllvpf tlnftitnlq ygedmghpgs rkfntterv
12421 qgllgpifkn tsvgplysgc rltslrsek d gaatgvdaic ihhldpkspg lnrerlywe
12481 sqltngikel gpytldr nsl yvngfthrts vptsstpgts tvdlgtsgtp fslpspata
12541 pllvlftlnf titnlkyeed mhrpgsrkfn ttervlqtll gpmfkntsvg llysgcrlt
12601 lrsekdgat gvdaicthrl dpkspgvdre glywelsqlt ngikelgpyt ldrnslyvn
12661 fthwipvpts stpgtstvd l gsgtpsslp s pttagpllv ftnftitnl kyeedmhcp
12721 srkfntterv lqslgpmfk ntsvgplysg crltllrsek dgaatgv dai cthrl d pks
12781 gvdreqlywe lsq ltngike lgpytldr n lyvngfthqt sapntstpgt stvdltsg
12841 psslp sptsa gp llvpftln ftitnlqyee dmhpgsrkf nttervlqgl lgpmfknts
12901 gll ysgcrlt llrpekngaa tgmdaicshr ldpkspgl n eqlywelsql thgikelgp
12961 tldrnslyvn gfthrssvap tstpgtstvd lgtsgtpssl pspttavpl vpftlnfti
13021 nlqygedmrh pgsrkfntte rvlqgllgpl fknssvgply sgcrllslrs ekdgaatgv
13081 aicthhlnpq spgldreqly wqlsqmtngi kelgpytldr nslyvngfth rssglttstj

```

FIGURA 9 (página 5 de 6)

```

13141 wtstvdldgts gtpspvpspt ttgpllvpft lnftitnlqy eenmghpgsr kfnitesvl
13201 gllkplfkst svgplysgcr ltllrpekdg vatrvdaict hrpdpkipgl drqqlywel
13261 qlthsitelg pytlldrdsly vngftqrssv pttstpgtft vqpetsetps slpgptatg
13321 vllpftlnft itnlqyeedm rrpgsrkfnt tervlqgllm plfkntsvss lysgcrltl
13381 rpekdgaaatr vdavcthrpd pkspgldrer lywklsqllh gitelgpytl drhslyvng
13441 thqssmtttr tpdttstmla tsrtpaslsg pmtaspllv ftinftitnl ryeenmhhp
13501 srkfntterv lqgllrpvfk ntsvgplysg crltllrpkk dgaatkvdai ctyrpdpk
13561 gldreqlwe lsqllthsite lgpytlldrds lyvngftqrs svpttsipgt ptvdlgtsg
13621 pvs kpgpsaa spllvltln ftitnlryee nmghpgsrkf nttervlqgl lrsfksts
13681 gplysgcrlt llrpekdgta tgvdaicthh pdpk sprldr eqlywelsql thnitelgp
13741 aldndslfvn gfthrsvst tstpgtptvy lgasktpasi fgpsaashll ilftlnfti
13801 nlryeenmwp gsrkfntter vlgllrpplf kntsvgplys gcrltllrpe kdgeatgvd
13861 icthrpdptg pgldreqlly elsqllthsit elgpytlldr slyvngfthr ssvpttstg
13921 vseepftlnf tinnlrymad mgqpgslkfn itdnavmqlh splfqrssl garytgcervi
13981 lrsvkngaet rvdllctylq plsgpglpik qvfhelssqt hgitrlgpys ldkdslyln
14041 ynepgpdepp ttpkpattfl pplseattam gyhlktltln ftisnlqysp dmkgksatf
14101 stegvlqhl rplfqkssmg pfylgcqlis lrpekdgat gvdttctyhp dpvgpgldi
14161 qlywelsqlt hgvttqlgyv ldrdsalfing yapqnlisrg eyqinfhivn wlnspdppt
14221 seyitllrdi qdkvttlykg sqlhdtfrfc lvtnltdsv lvtvkalfss nldpslveq
14281 fldktlnasf hwlgstyqlv dihvtemess vyqptssst qhfylnftit nlpysqdk
14341 pgttnyqrnk rniedalnql frnssiksyf sdcqvstfrs vprnhhtgvd slcnfspla
14401 rvdrvaiyee flrmtrngtq lqnftldrss vlvdgyspnr nepltgnsdl pfwavilig
14461 agllgvitcl icgvlvttr rkkegeynvq qqcpgyyqsh ldledlq

```

## (B) Péptido 1

14394 14410  
nfsplar rvdrvaiyee (SEQ ID NO:01)

## (C) Péptido 2

14425 14442  
tldrss vlvdgyspnr ne (SEQ ID NO:02)

## (D) Péptido 3

14472 14492  
cgvlvttr rkkegeynvq qq (SEQ ID NO:03)

## (E) Región transmembrana:

14452 14475  
fwaviligl agllgvitcl icgvl (SEQ ID NO:14)

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

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

FIGURA 9 (página 6 de 6)

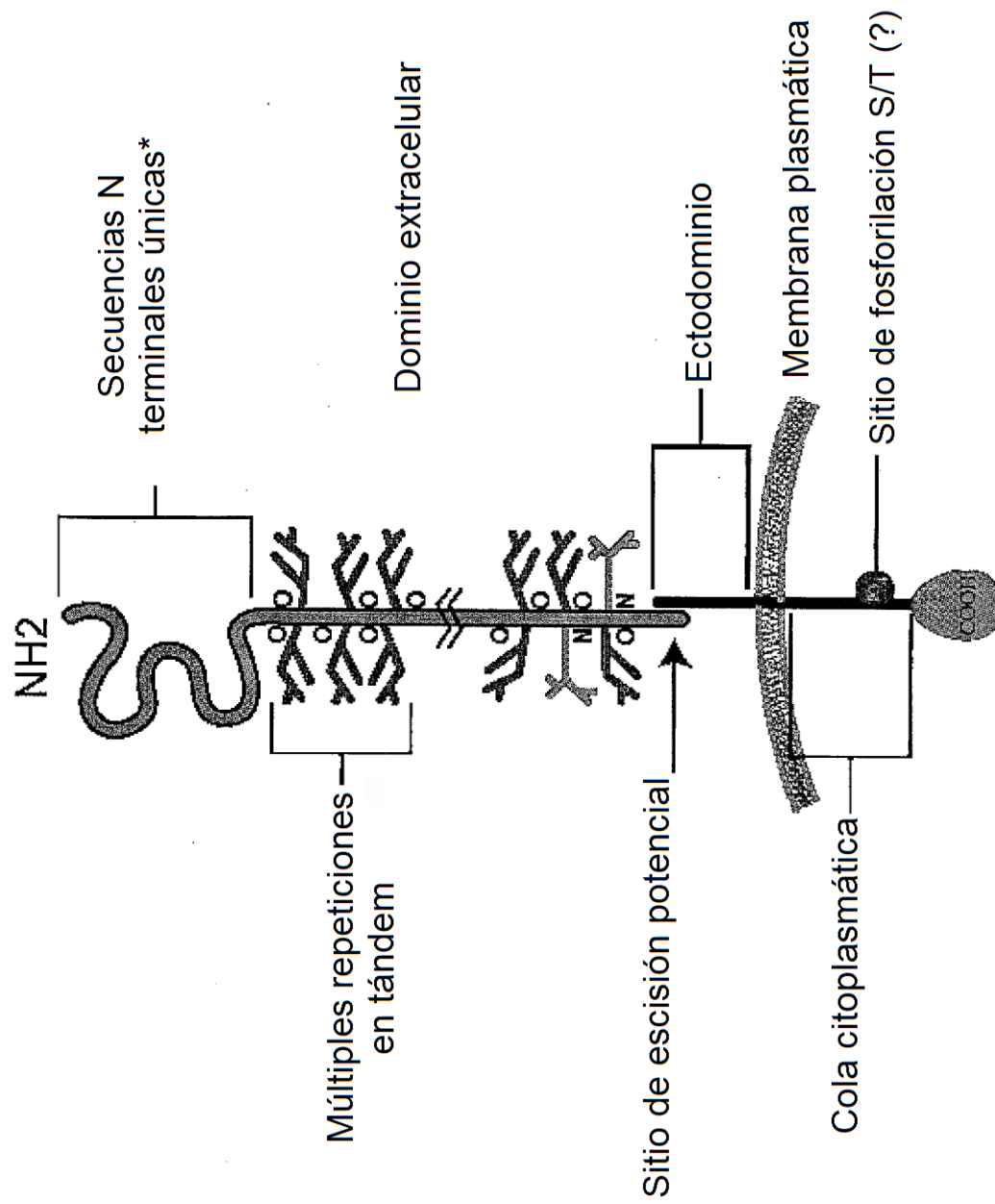


Figura 10

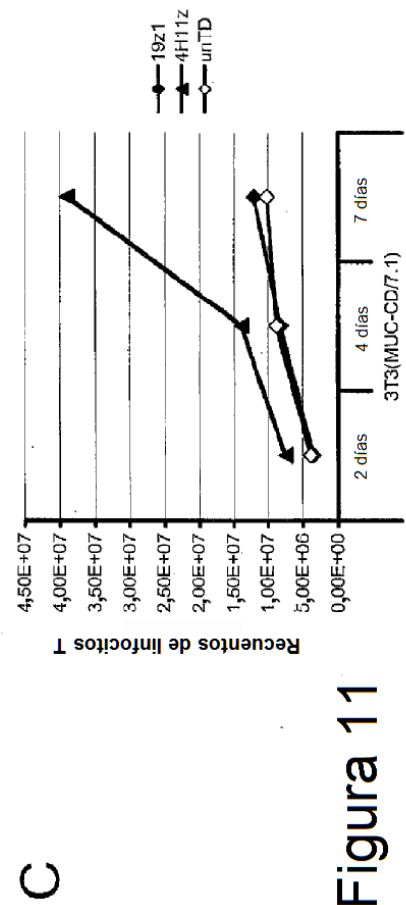
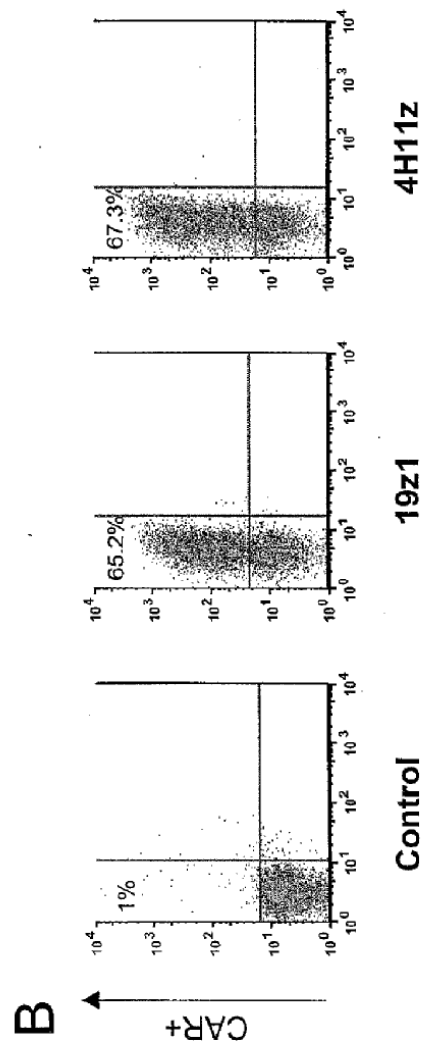
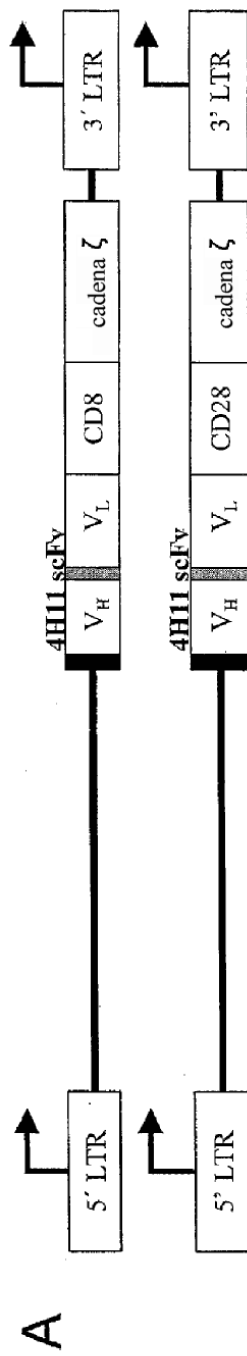


Figura 11



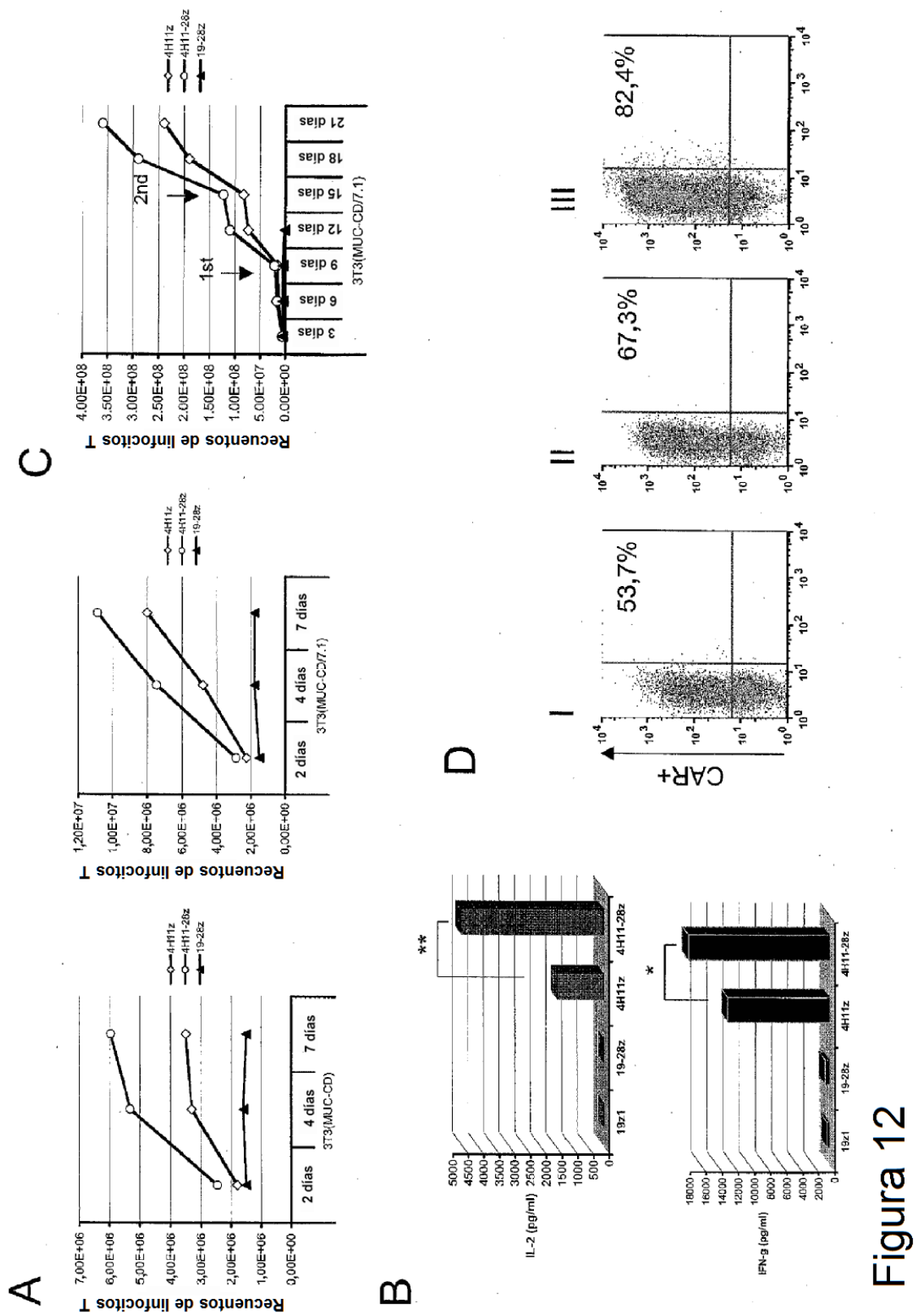


Figura 12

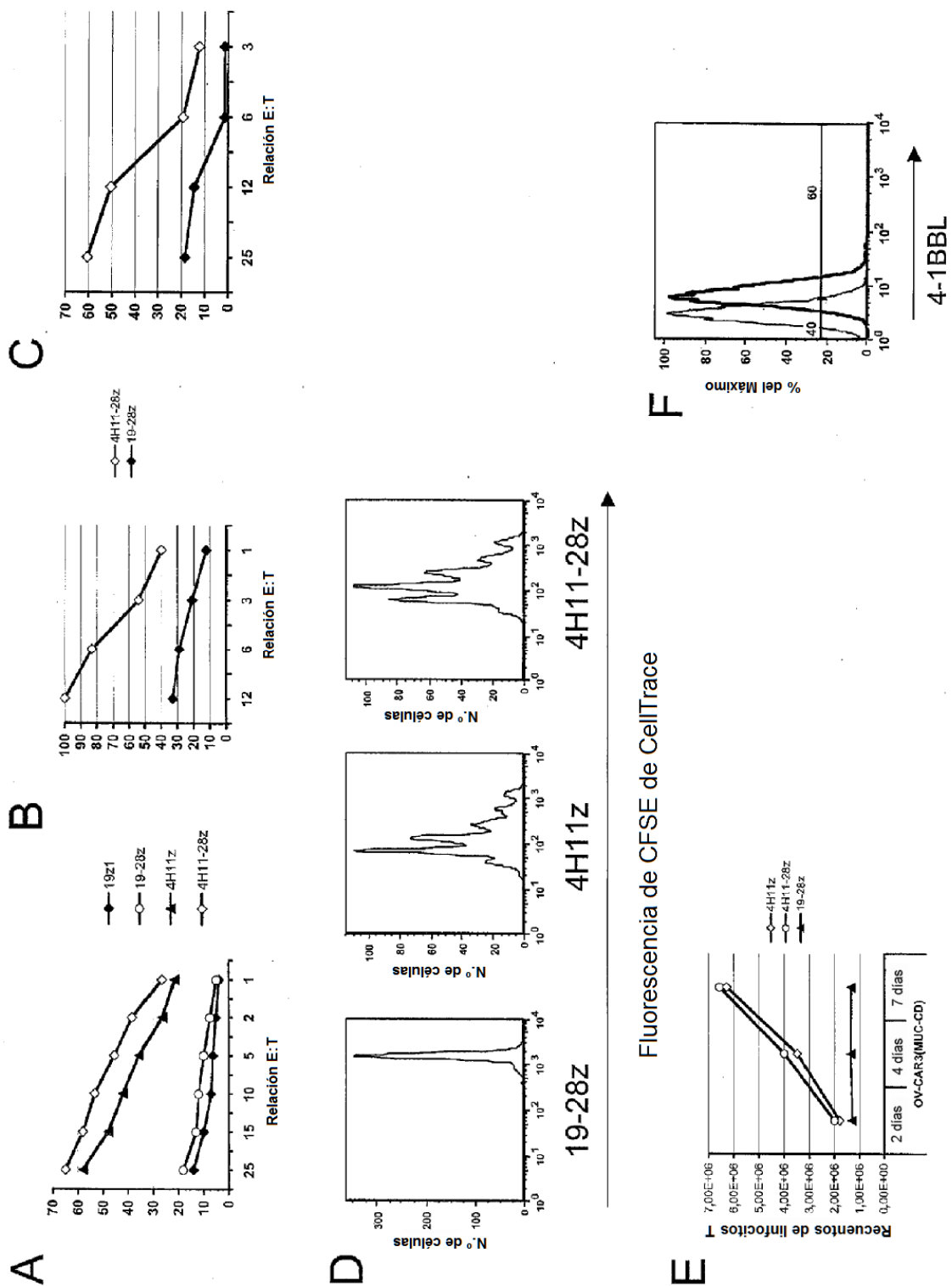


Figura 13

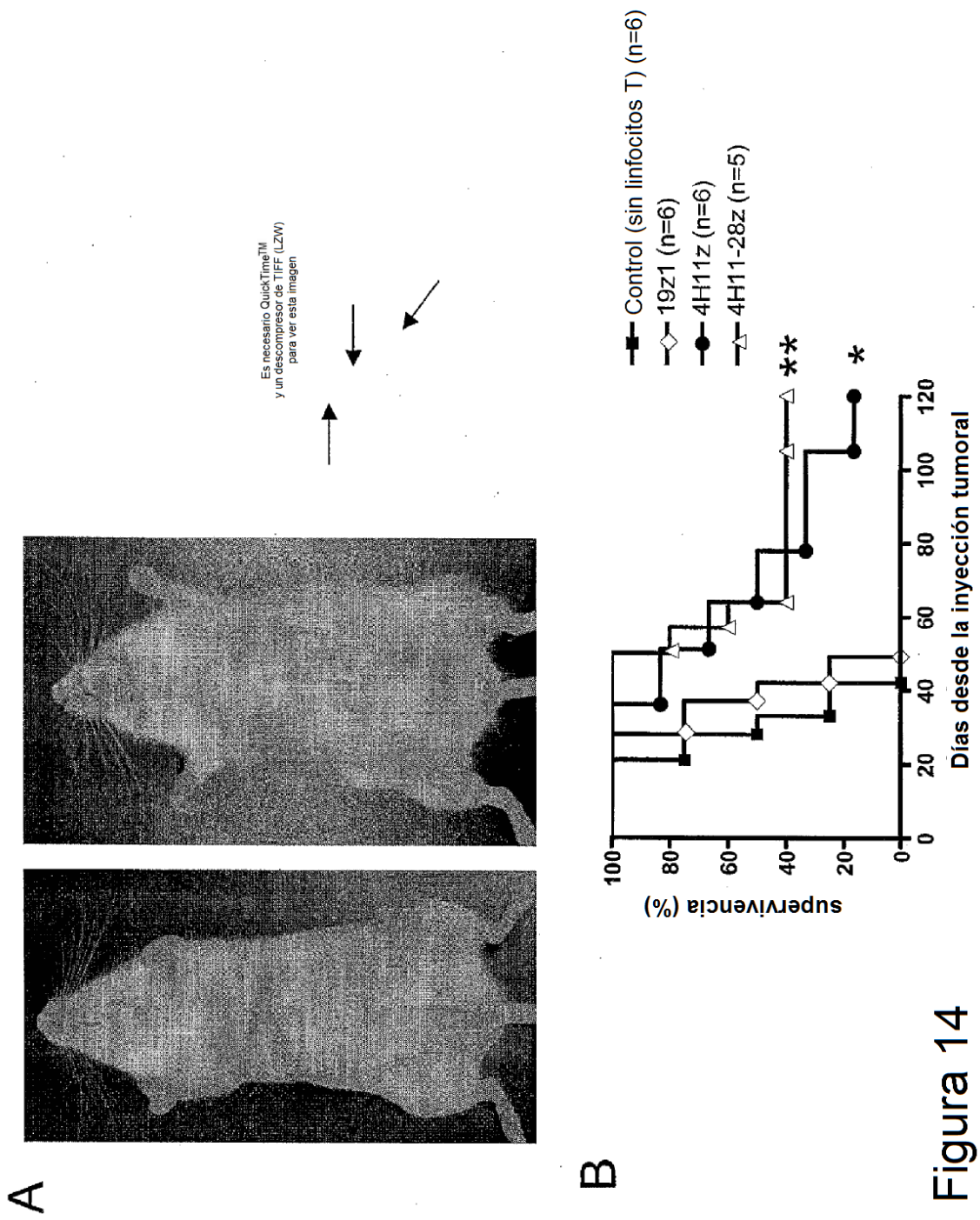


Figura 14

A

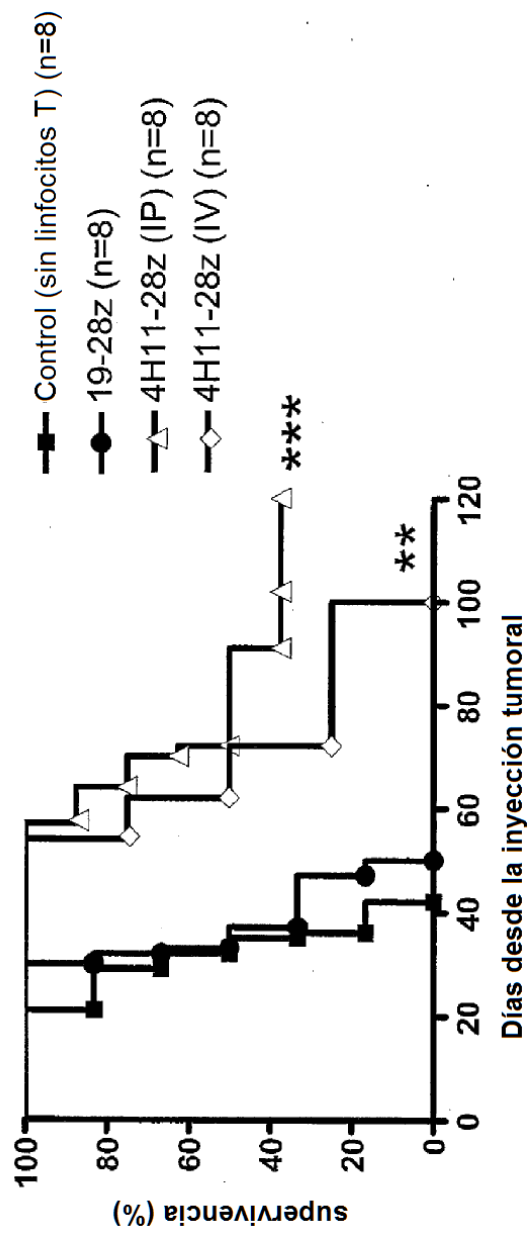
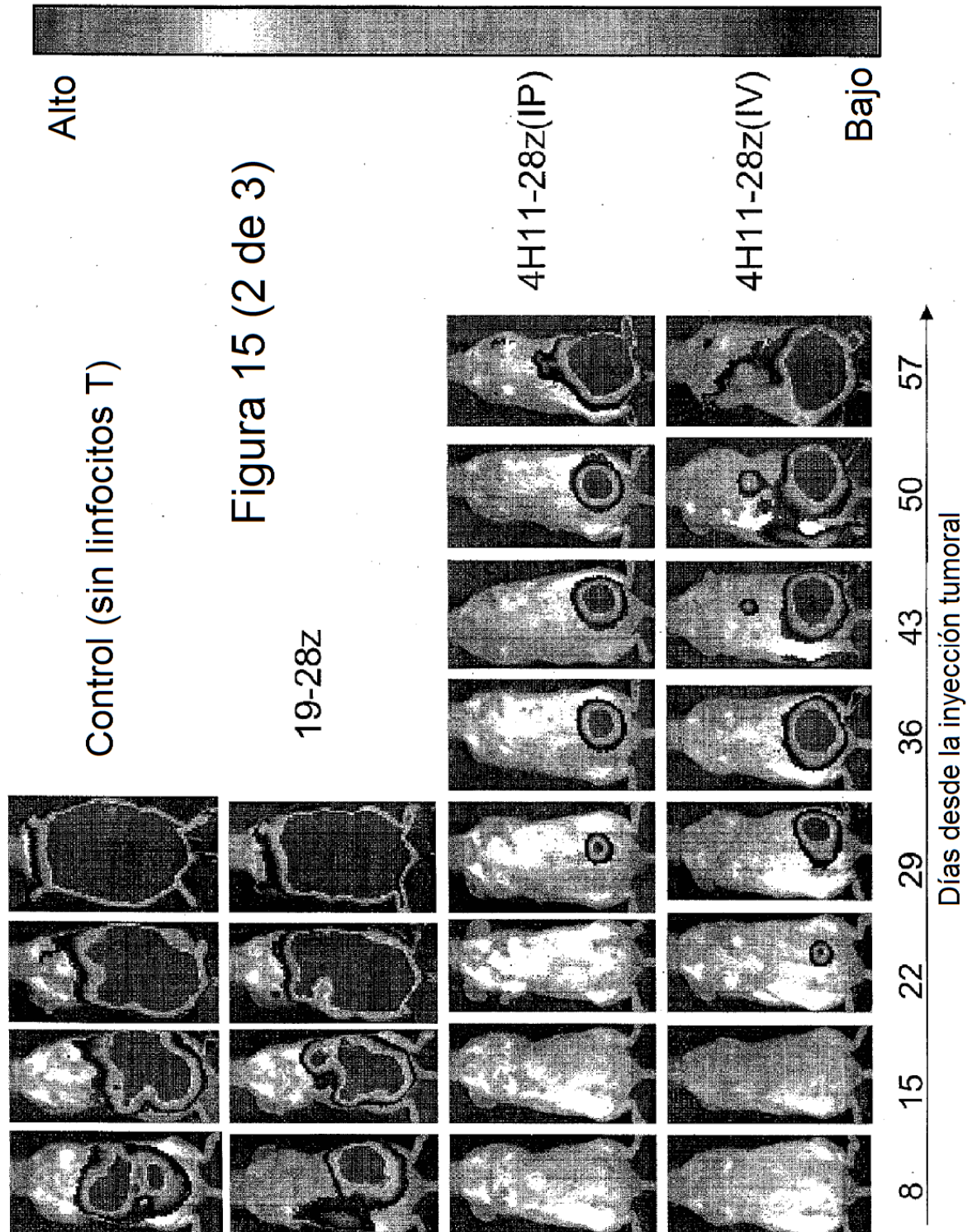


Figura 15 (1 de 3)

B





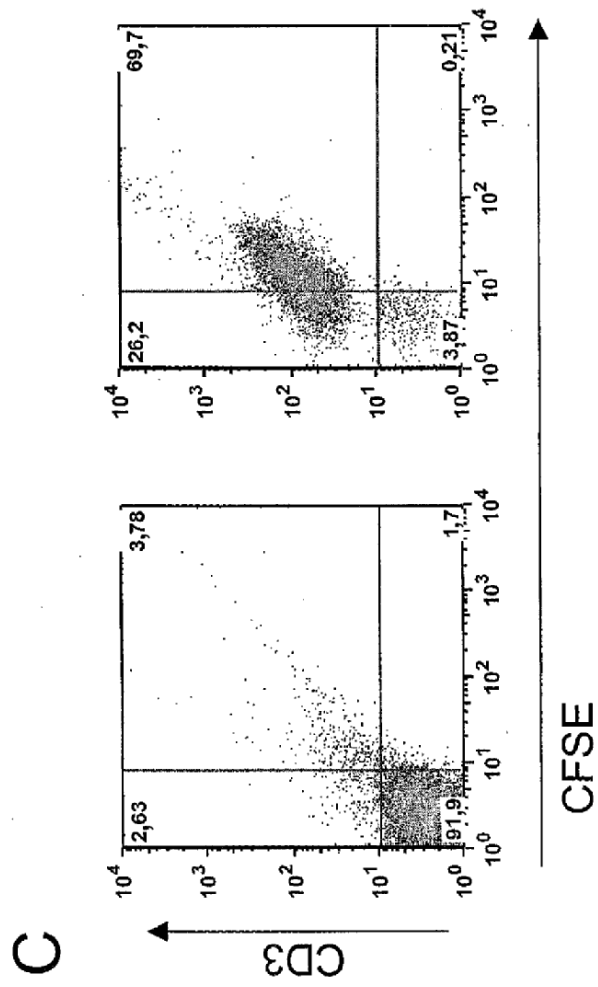


Figura 15 (3 de 3)

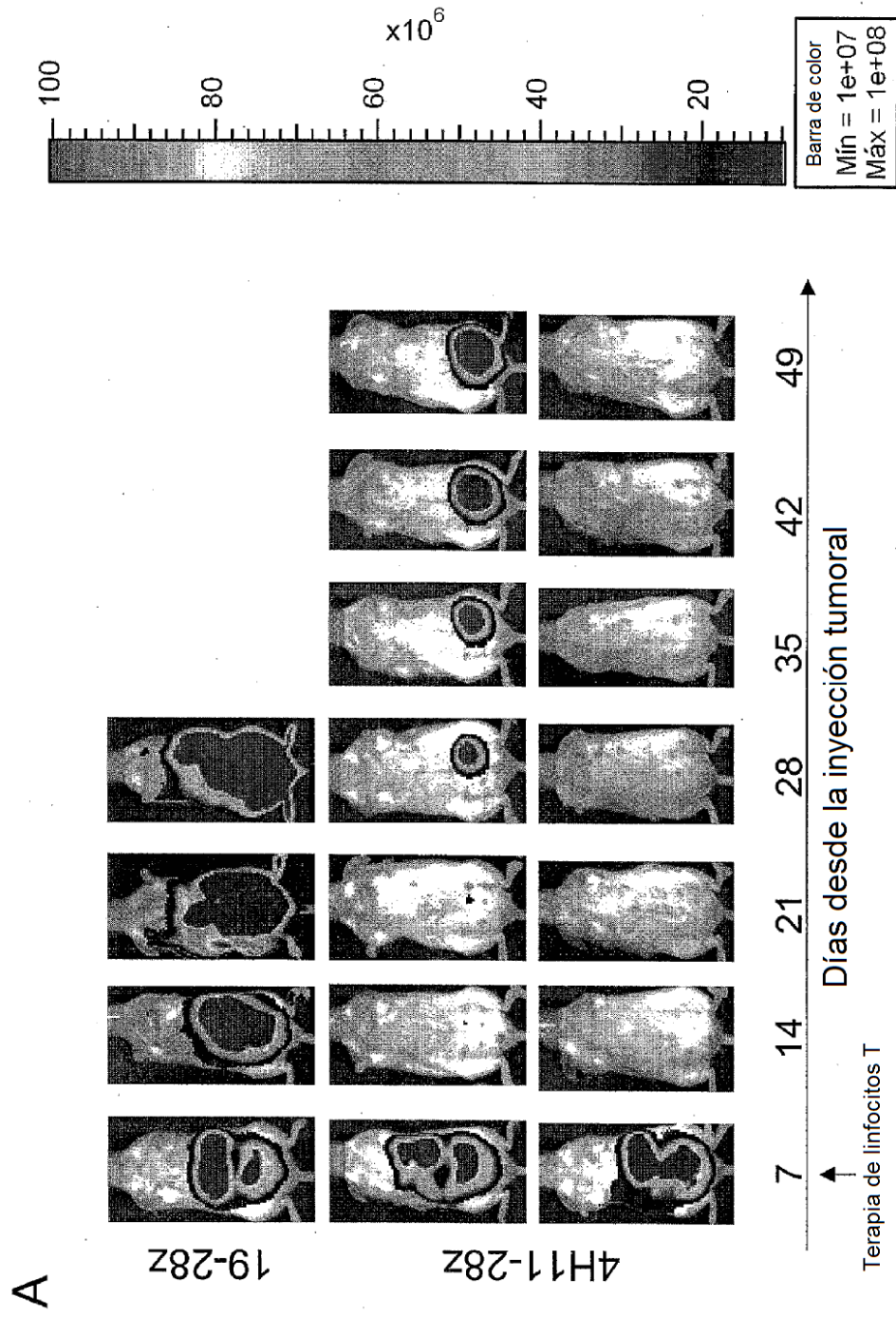


Figura 16 (1 de 2)

B

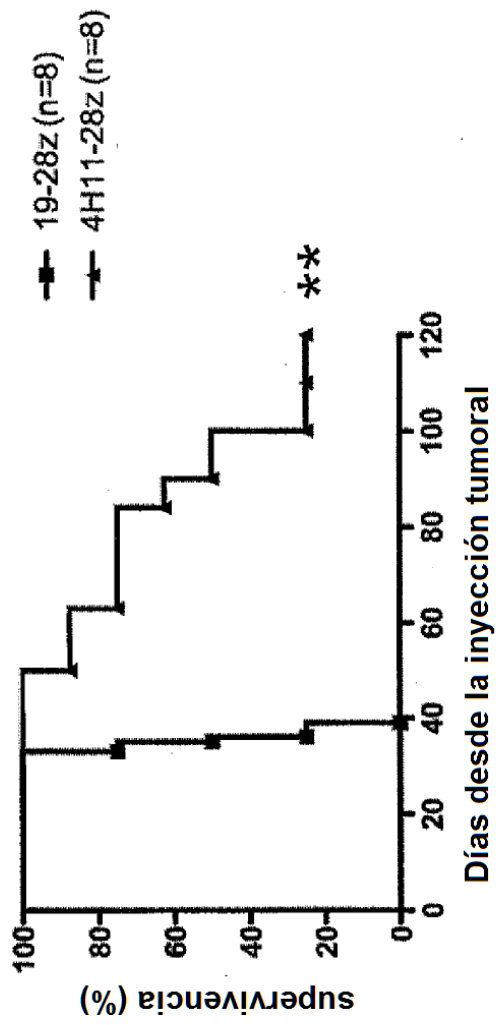


Figura 16 (2 de 2)

Secuencia líder de CD8

ATGGCTC TCCAGTGAC TGCCCTACTG CTTCCCCTAG CGCTTCTCCT GCATGCAGAG

**Dominio intracelular de cadena zeta de CD3**

AGAGT GAAGTTCAGC AGGAGCGCAG AGCCCCCGC GTACCAGCAG GGCCAGAACC AGCTCTATAA  
CGAGCTCAAT CTAGGACGAA GAGAGGAGTA CGATGTTTTG GACAAGAGAC GTGGCCGGGA CCCTGAGATG  
GGGGGAAAGC CGAGAAGGAA GAACCCTCAG GAAGGCCTGT ACAATGAACT GCAGAAAGAT AAGATGGCGG  
AGGCCTACAG TGAGATTGGG ATGAAAGGCG AGCGCCGGAG GGGCAAGGGG CACGATGGCC TTTACCAGGG  
TCTCAGTACA GCCACCAAGG ACACCTACGA CGCCCTTCAC ATGCAGGCCC  
TGCCCCCTCG

Enlazador de serina-glicina (G4S) 3

GGTG GAGGTGGATC AGGTGGAGGT GGATCTGGTGGAGGTGGATC T

Dominio transmembrana de CD8

GCGGCCGCAC CCACCACGAC GCCAGCGCCG CGACCACCAA CCCC GGCGCC CACGATCGCG TCGCAGCCCC  
TGTCCCTGCG CCCAGAGGCG TGCCGGCCAG CGGCGGGGGG CGCAGTGCAC ACGAGGGGGC TGGACTTCG  
CTGTGATATCTACATCTGGG CGCCCTTGGC CGGACTTGT GGGGTCCTTC TCCTGTCACT GGTTATCACC  
CTTTACTGCA ACCAC

Dominios transmembrana + intracelular de CD28 (-TERMINACIÓN)

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

Figura 17

BamHI  
-----  
1 GGATCCGGAT TAGTCCAAAT TGTAAAGAC AGGATATCAG TGGTCCAGGC TCTAGTTTTG ACTCAACAAT ATCACCAGCT GAAGCCTATA GAGTACGAGC  
CCTAGGCGCTA ATCAGGTAA ACAATTTCTG TCCATATATC AGATAGCCG AGATCAAAAC TGAGTGTGTA TGGTGTGGA GTTCGATAT CTCTGATAT CGCCATTTG  
CATAGAPAAA ATAAAGATT TTATTTAGTC TCCGATAAAA GGGGGGATG AAAGACCCCA CCTGTAGGTT TGCCTAAGTA CTTTAAGTAA CGCCATTTG  
GTATCTATTT TATTTCTAA ATTAATACAG AGGTCTTTT CCCCCTTAC TTTCCTGGGT GGACATCCAA ACCGTTCGAT CGAATCAAT CGCGTAAAC  
CAAGCATGG AAAATACAT AACTGAGAA AGAAGATC TCTCTCAAG TCTAGTTCCA GTCCCTGTCT AGCTGTGCGA CTTATATCCG TTCTGTCTA TAGACACCAT  
GTTCCGTACC TTTTATGTA TTGACTCTTA TTGACTCTTA TCTCTCAAG TCTAGTTCCA GTCCCTGTCT AGCTGTGCGA CTTATATCCG TTCTGTCTA TAGACACCAT  
AGCAGTTCTT GCCCGGCTC AGGCGCAAG ACAGATCGAA ACAGATCGAA GTTCAGAT TGGGCGAAG AGGATATCTG TCCATATAGC AGGTAAGCAG GTTCGTGCCC  
TCGTCAAGGA CGGGCCGAG TCCCGGTTCT TGTCTACCTT GTGACTATAT ACCCGTTTG TGGGCGAAG AGGATATCTG TCCATATAGC AGGTAAGCAG GTTCGTGCCC  
CAAGAACAGA TGGTCCGAG ATCGGTCCA GCCCTACGA GTTCTAGAG AACCATCAGA TGTTCAGG GTGCCCCAAG GACCTGAAT GACCTGTGC  
GTTCTGTCT ACCAGGGTC TACGCCAGT CGGAGTCTGT CAAAGATCTC TTGGTAGTCT ACAAGTCTC CACGGGTTC CTGGACTTTA CTGGGACACG  
CTTATTTGAA CTAACCAATC AGTTCGCTC TCGCTCTGT TCGCGGCTT CTGCTCCCG AGCTCAATAA AAGAGCCAC AACCCCTCAC TCGGGCGCC  
GAATAAATTT GATTGGTTAG TCAAGCGAAG AGCAAGACA AGCGCGAA GACGAGGGC TCGAGTTAT TTCTCGGGT TGGGGGATG AGCCCCGG  
AGTCCCTCGA TTGACTGAGT CGCCGGGTA CCGGTGTATC CAATAAACCC TCTTGAGT GCATCCGACT TGTGTCTCG CTGTCTCTG GAGGCTCTC  
TCAGGAGGCT AACTGACTCA GCGGCCCCAT GGGACATAG GTTATTTGG AGAAGTCAA CGTAGGCTGA ACACGAGC GACAAGAAC CCTCCAGAG  
CTCTGATGA TTGACTACCC GTACGCGGG GTCTTTTACA CATGAGCAT GTATCAAAAT TAAATTGGTT TTTTCTCTTA AGTATTTACA TTAATGGGC  
GAGACTCACT AACTGATGG CAGTCCCTTG AATAAACAT GAGTATCTA CATAGTTTGA ATTAAACCAA AAAAAAAT TCAATAATGT AATTACCGG  
ATAGTACTTA AAGTACATT GGCCTCCTTG AATAAACAT GAGTATCTA CATAGTTTGA ATTAAACCAA AAAAAAAT TCAATAATGT AATTACCGG  
TATCATGAAT TTCAATGTA CCGAAGGAAC TTTATTTGTA CCTCATAGT CTTACACAGT ATTTATAAG ATTAAATTC TATCATAGAG GTAACCGAA  
CTACTTTTC TTTTATTTT TTTTGTCTC TGTCTTCCAT TTGTGTGTG TGTGTGTGT TGTGTGTGT TGTGTGTGT TGTGTGTGT TGTGTGTGT  
GATGAAAAA AAAATAAAA AAAACAGAG ACAGAGGTA ACACACACA ACTGGGCCC ACTGGAACTT CAGTACCCCA GTCATGGGA CACCTGCTGT TTAGCCTCC CACATCTAAG  
TAGGATGTA TATCAAGTTC GATCTGATA TCGATGAGT ACAGAGGTA ACACACACA ACTGGGCCC ACTGGAACTT CAGTACCCCA GTCATGGGA CACCTGCTGT TTAGCCTCC CACATCTAAG  
ATTACAGTA TGAGCTATCA TTTTGTGGT ATTTGATGAT TCAATGATG TCAATGATG TCAATGATG TCAATGATG TCAATGATG TCAATGATG TCAATGATG  
TAATGTCCAT ACTCGATAGT AAAACACATA TAATAACTTA TAATAACTTA TAATAACTTA TAATAACTTA TAATAACTTA TAATAACTTA TAATAACTTA TAATAACTTA  
ATGGGTGTGT GTGATGTGT GTATGTATGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT  
TACCCACACA CACTTACACA CATACATACA CACACACACT CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA  
GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT  
CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA

EcORI  
-----  
1401 TTTTGGAGC AGAGTCTTC ACTTAGCTTG GAATTCATCG GCGTCTGTTT TACAACGTCTG TGACTGGGA AACCTTGGG TTACCCAACT TAATCGCTT  
AAAACTCTG TCTCAGAAAG TGAATCGAAC CTTAAGTGAC CGGCAGCAA ATGTTGCAGC ACTGACCCCTT TTGGGACCGC AATGGGTTGA ATTAGCGGA  
GCAGCATATC CCCCCTTTCG CAGCTGGCTG AATAGCGAAG AGCCCCCAG CAGTCCCTCT TCCCAACAGT TGGCAGGCT GAATGGGAA TGGCGCTGA  
CGTGTGTAG GGGGAAGCG GTCCACGCA TTATCGCTC TCCGGGCTG CTTAGCGGA AGGTTGTCA ACGGTCTGA CTTACCGCTT ACCCGGACT  
TCCGTATTT TCTCTTAC CATCTGTG GTATTTTACA CCGCATATG TGCATCTCA GTACATCTG CTTCTGATCC CATATCTA CCGTCCGCTT  
ACGCCATAA AGAGGAATGC GTACACACG CATAAAGTGT GCGGTATACC ACGTATAGC GAGACTACGG CATGTCAAT CCGTCCGCTT  
ACACCGCCA ACACCGCTG ACGCGCTGT TGTCTCTGT TGTCTCTGT TGTCTCTGT TGTCTCTGT TGTCTCTGT TGTCTCTGT TGTCTCTGT  
TGTGGCGGT TGTGGCGGT TGTGGCGGT TGTGGCGGT TGTGGCGGT TGTGGCGGT TGTGGCGGT TGTGGCGGT TGTGGCGGT TGTGGCGGT  
AGGTTTTC CGTATCAC CGTATCAC CGTATCAC CGTATCAC CGTATCAC CGTATCAC CGTATCAC CGTATCAC CGTATCAC CGTATCAC  
TCCAAAGTG GCAGTAGTG CTTTGGCGC TACTGTCTT CCGAGCACT ATGCGATAA AATATCAA TTACAGTACT ATTTATCCA AAGAATCTGC  
TCAGTGGCA CTTTTCGGG AATGTGCGC GGAACCCCTA TTTGTTTAT TTTCTAATA CATCAATA TGTATCCGT CATGAGCAA TAACCTGTAT  
AGTCCACCGT GAAAGCCCT TTTACACGG CTTTGGGAT AACAATAA AAGATTTAT GTAATTTAT TGTATCCCTT ATTTGGGACTA  
AAATCGCTCA ATATATTTGA AAAAGGAGA GTTGTGCTG TCAACATTTT CAGTCCGCTT TTTTGGGCA TTTTGGCTTC CTGTTTGTG  
TTTACGAGT TATTATACT TTTTCTTCT CATACTCAT AGTTGTAAG GCACAGCGG AATAAGGGA AAAACGCCGT AAAACGGGAG GACAAAACG

Figura 18 (1 de 5)



2101	TCACCAGAA	ACGCTGGTGA	AAGTAAAGA	TGCTGAAGAT	CAGTTGGGTG	CACGAGTGGG	TTATCATGAA	CTGGATCTCA	ACAGCGGTAA	GATCCTTGAG
	AGTGGGCTTT	TGCGACCACT	TTCAATTTCT	ACGACTCTTA	GTCAACCCAC	GTGCTCACCC	AATGTAGCTT	GACCTAGAGT	TGTCGCCATT	CTAGGAATC
2201	AGTTTTCGCC	CCGAAGAAG	TTTTCCAAATG	ATGAGCACTT	TTAAAGTTCT	GCATATGTGC	CCGATATTAT	CCCGTATTGA	CGCCGGGCAA	GAGCAACTCG
	TCAAAAGCGG	GGCTTCTTGC	AAAAGGTATC	TACTCTGTGA	AATTTCAAG	CGATACACCG	CGCCATATATA	GGGCATAAAT	CGGCCCGGTT	CTCGTTGAGC
2301	GTCCGCCGAT	ACACTATTCT	CAGAATGAT	TGGTTGAGTA	CTCACAGTC	ACAGAAAAGC	AFTCTACGGA	TGCGATGACA	GTAAGAGAA	TATGCAOTGC
	CAGCGGCGTA	TGTGATAAAG	GTCTTACTGA	ACCAACTCAT	GAGTGTCTAG	TGCTTTTTCG	TAGAATGCTT	ACCGTACTGT	CATTCTCTTA	ATACGTACCG
2401	TGCCATAACC	ATGAGTGATA	ACACTGCGGC	CAACTTACTT	CTGACAACGA	TGCGAGGACC	GAAGGAGCTA	ACCGCTTTT	TGCACACAT	GGGGGATCAT
	ACGGTATTGG	TACTCACTAT	TGTGACGCCG	GTITGAATGA	GACTGTGCTG	AGCCTCCTGG	CTTCTCTCAT	TGCGGAAAA	ACGTGTGTA	CCCCCTAGTA
2501	GTAACTCGCC	TTGATCGTTG	GGAAACCGAG	CTGAATGAAG	CGATACCAAA	CGACGAGCGT	GACACACAGA	TGCTGTGAGC	AATGGCAACA	ACGTTTGGCA
	CATTGAGCGG	AATAGCACTA	CTTTGGCCTC	GACTTACTTC	GGTATGGTTT	CGTCTCGCA	CTGTGGTGT	ACGGACATCG	TTACCGTTGT	TGCAACGCGT
2601	AACATATTAC	TGCGGAACCTA	CTTACTCTAG	CTTCCGGCA	ACAAATAA	GACTGGATGG	AGCGGGAATA	AGTTGACGGA	CCACTTCTGC	GCTCGGCCCT
	TGTAAATTG	ACGCTTGTAT	GAATGAGATC	GAAGGGCCGT	TGTTAATTAT	CTGACCTACC	TCCGCCATTT	TCAACGCTCT	GGTGAAGACG	CGAGCCGGGA
2701	TCCGGCTGGC	TGTTTATTG	CTGATAAATC	TGGAGCGCGT	GAGCTGGGTT	CTCGCGTAT	CATTGACAGA	CTGGGGCCAG	ATGGTAAGCC	CTCCGCTATC
	AGCGCGACCG	ACCAAAATAC	GACTATTAG	ACCTCGGCCA	GAGCGCCATA	GAGCGCCATA	GTAACTGTCT	GACCCCGGTC	TACCATTGG	GAGGCGATAG
2801	GTAGTTATCT	ACAGACGGGG	GAGTCAGGA	ACTATGGATG	AACGAAATAG	ACAGATCGCT	GAGATAGGTT	CCTCACTCAT	TAAGCATGG	TAACTGTCTAG
	CATCAATAGA	TGTGCTGCC	CTCAGTCCGT	TGATACCTAC	TGCTTTATC	TGCTTAGCGA	CTCTATCCAC	GGAGTGACTA	ATTGTAACC	ATTGACAGTC
2901	ACCAAGTTTA	CTCATATATA	CTTTAGATTG	ATTTAAACT	TCATTTTAA	TTTAAAGGA	TCTAGGTGAA	GATCCTTTT	GATAATCTCA	TGACCAAAAT
	TGTTTCAAA	GAGTATATAT	GAATCTAAC	TAAATTTGA	AGTAAAAAT	AAATTTCTCT	AGATCCACTT	CTATTAAGAT	CTGTGCTTTA	ACTGGTTTAA
3001	CCCTTAACTG	GAGTTTTCGT	TCCACTGAGC	GTACAGCCCC	GTAGAAAAGA	TCAAAGGATC	TTCTTGAGAT	CTTTTCTTTC	TGCGCGTAA	CTGCTGCTTG
	GGGAATTGCA	CTCAAAAGCA	AGGTGACTCG	CAGTCTGGG	CATCTTTCT	AGTTTCTTAG	AAGAACTCTA	GGAAAAGAA	ACGGCATTAA	GACGACGAAC
3101	CAACACAAA	AACACCCGCT	ACCAGCGGTG	GTITGTTGCG	GGATCAAGA	GCTACCAACT	CTTTTCTCGA	AGTAACTGCG	CTTCAGCAGA	CGCGAGATAC
	GTITGTTTCT	TTGGTGGGCA	TGTCGCGCAT	CAAAACAAAG	CCCTAGTTCT	TGATGTTGA	GAATAAGGCT	TCCATTAAGC	GAAGTCTGT	CGCTCTATG
3201	CAATATCTGT	CCCTCTAGTG	TAGCCGTAAT	TAGGCCACCA	CTTCAAGAAC	CTCTAGCAC	CGCTACATA	CCTCGCTCTG	CTAATCCTGT	TACCACTGGC
	GTTATGACA	GGAAATGATC	ATCGGCAATC	ATCCGGTGGT	GAAGTCTTTC	AGACATCTGT	CGGATGATAT	GGAGCGACGA	GATTAGACA	ATGCTCACCG
3301	TGCTGCCAGT	GGGATAAGT	CGTGTCTTAC	CGGGTTGGAC	TCAAGACGAT	AGTTACCCGA	TAAAGCGCAG	CGGTGCGGCT	GAAAGGGGG	TTCTGTGACA
	ACGACGGTCA	CGCTATTCA	GCACAGAAATG	GCCTCACTG	AGTTCTGTGA	TCAATGGGCT	ATTCGCGCTC	GCAGCCCGGA	CTTGCCCCC	AAGCACGTGT
3401	CAGCCAGCT	TGAGCGGAAC	GACCTACAC	GAATCAGCG	TGAGCATTTGA	GAAGGCGCA	CGCTTCCGGA	AGGGAGAAAG	CGGACAGGT	
	GTCCGGTCA	ACCTCGCTTG	CTGGATGTGG	CTTGACTCTA	TGGATGTGCG	ACTCTAACT	CTTTGCGCGT	GGAAAGGCT	TCCCTCTTTC	CGCTGTGCTA
3501	ATCCGGTAAG	CGCAGGGGTC	GGAAACAGAG	AGCGACAGAG	GGAGTCTCCA	GGGGAAACG	CTTGGTATCT	TTAATGCTCT	GTGCGGTTTC	GCCACTCTG
	TAGGCCATT	CGCGTCCAG	CCTTGCTCTC	TGCGGTGCTC	CCTCGAAGT	CCCGCTTTGC	GGACCATAGA	AATATCAGGA	CAGCCCAAAG	CGGTGGAGAC
3601	TGAATCGCA	GTAAAACA	CTACGAGCAG	TCCCGCCGCG	TCCGATACT	TTTTGCGGTC	GAAGCGCGCC	AAAAATGCCA	AGGACCGGAA	AACGACCGGA
	TTTGCTCACA	TGTTCTTTCC	TGCGTTATCC	CCTGATCTG	TGGATAACCG	TATTAACCGC	TTTTAGTGGC	CTGATACCGC	TGCGCCGAGC	CGAACGACCG
3701	AAACGAGTGT	ACAAAGAGG	ACGCAATAGG	GGACTAAGAC	ACCTATTGGC	ATAATGGCGG	AACTCACTC	GACTATGGCG	AGCGGCGTCG	GCTTGTGGC
	AGCGCAGCGA	GTCAGTGAGC	GAGGAAGCGG	AAGAGCGCC	AAATGCGG	CGCGCTCC	CCGCGCTTG	GAATGAGCT	TAATGAGCT	CGGACGACAG
3801	TCCGCTCGCT	CAGTCACTGG	CTCCTTCGCC	TTCTCGGGG	TTATCGGTTT	GGCGGAGAG	GGCGCGCAAC	CGGCTAGTA	ATTACGTCGA	CGCTGTCTG
	GTTCCTCCGAC	TGGAAAAGGG	GCAGTGAGCG	CAACGCAAT	AATGTGAGT	AGCTCACTCA	TTAGGCAACC	CAGGCTTTAC	ACTTTATGCT	TCCGGCTCGT
3901	CAAAGGGCTG	ACCTTTCGCC	CGTCACTGCG	GTTCGGTTAA	TTACACTAA	TGAGTGTGAGT	AATCCGTGGG	GTCCGAAATG	TGAATACGA	AGGCGGACGA
	ATGTTGTGTG	GAATGTGTCAG	CGGATAACAA	TTTCACACAG	GAACACAGTA	TGACCATGAT	TAGCCCAAGC	TTTGCTCTTA	GGAGTTCTCT	AATACATCCC
4001	TACACACAC	CTTAACACCA	GCTTATTGTT	AAAGTGCTCT	CTTTGTCGAT	ACTGCTACTA	ATCGGTTTTC	AAACGAGAT	CCTCAAGGA	TTATGTAGGG
	AAACTCAAA	TATATAAGCA	TTTGACTTGT	TTTGACTTGT	TTTGACTTGT	AGGGGCGGG	GGGAAGCTAA	GCACAGTTT	TTTAACTAT	AAAAATGTA
4101	TTTGAGTTTA	TATATTTCGT	AAACTGAACA	AGATACGGBA	TCCCGCGGCC	CCCTTCGAT	CGGTGCAAAA	AAATGTA	TTTTACAAT	AAGTAAAT
	AATGCACAGA	TGTTTTTAT	TCATAAGGGT	TTCAATGTC	ATGAATGCTG	CAATATTCT	GTACACCAAG	CTAGTATAAA	TAAAAATAGA	TAAAGTGGGA
4201	TTACGTGTCT	ACAAAATAA	AGTATTCCCA	AAGTTACAG	TACTTACGAC	GTATTAAGGA	CAATGGTTTC	GATCATATTT	ATTTTATCT	ATTTGACCT
	AATTACTTAG	AGTTTCTGTC	ATTAAACGTT	CCTTCTCTAG	TTGACACAT	AAATGGGCTG	CTGAGCAAGC	CAGTTTGCAT	CTGTCCAGAT	CAATTTCCCA
4301										

Figura 18 (2 de 5)

4401 TTAATGATC TCAAGACAG TAATTGCMAA GGAAGGAGTC AACTGTTGTA TTACGCGAC GACTCGTTCC GTCAACGTA GACATCCCTA GTTAAAGGT  
 TTATGCCAGT CATATTAAT ACTAGTCAAT TAGTTGATTT TTAATTTTGA CATATACATG TGAATGAAAG ACCCACCTCG TAGGTTTGGC AAGCTAGCTT  
 AATACGGTCA GTATATATAA TGATCAGTTA ATCAACTAAA AATAAAACT GTATATGTAC ACTTACTTTC TGGGGTGGAC ATCCAAACCG TTCGATCGAA  
 AAGTAACGCC ATTTTGCAGG GCATGGAAG ATACATAACT GAGAATAAG AAGTTCAGAT CAAGTCAGG ACAGATGA ACAGCTGAAT ATGGGCCAAA  
 TTCATTGCGG TAAACGTTTC GTTACCTTTT TATGATTTGA TGTATATTA GGTATATCTT TTCAAGTCTA GTTCCAGTCC TTGTCTACAT TGTGACATTA TACCCGGTTT  
 CAGGATATCT GTGGTAAGCA GTTCTGCCC CGGCTCAGGG CCAAGACAG ATGGAACAGG TGAATATGGG CCAAAACAGG TATCTGTGTT AAGCAGTTCC  
 GTCCTATAGA CACCATTCGT CAAGAACGGG GCGAGTCCC GGTCTTGTG TACCTTGTG ACTTATACCC GGTGTGCTT ATAGACCCA TTCGTCAAGG  
 TGCCCCGGCT CAGGCCCAAG AACAGATGTT CCCAGATGC GGTCCAGCCC TCAGCAGTTT CTAGAGAACC ATCAGATGTT TCCAGGGTGC CCCAAGGACC  
 ACGGGGCCGA GTCCCGGTTT TTGTCTACCA GGGTCTACG CAGGTCGGG AGTCGTCAA AGTCCACAG AGTCCACAG GGTTCCTTGG  
 4801 TGAATGAAC CTGTGCTTAA TTTGAACATA CCAATCATTT CGCTTCTCG TTCTGTTCG CGCTTATGC TCCCGAGCT CAATAAAGA GCCCACAACC  
 ACTTACTGG GACACGGAAT AAATGATTT GGTATGTCAA GCGAAGACG AAGACAAGCG CGGAATACG AGGGCTCGA GTTATTTCT CGGGTGTGG  
 4901 CCTCACTCG GCGGCCAGTC CTCGATTTGA CTGATCGCC CGGTACCCG TGTATCCAAT AAACCTCTT GCAGTTGCAT CCGACTTGT GTCTCGCTGT  
 GGAGTGAGCC CCGCGTCTAG GAGCTAACT GACTCAGGG GCCATGGG ACATAGTTA TTTGGGAGMA CGTCAACGTA GGTGAACAC CAGAGGACA  
 5001 TCCTTGGGAG GGTCTCTCT GAGTATTA CTACCCGTC GCGGGGTCT TCAATTGGG GGTCTGTCG GATCGGGAG ACCCTGCCC AGGACCAACC  
 AGAACCCCTC CCAGAGGAGA CTCATAACT GATGGGCACT GATGGGCACT GCGCCCCAGA AAGTAAACCC CCGACAGGC CCAATGAGG TCCCTGTGG  
 5101 GACCCACCAC CGGAGGTAA GCTGGCCAGC ACTTATCTG TGTCTGTCG ATTGTAGT GTCTATGCT GCTGCTGCTG GCTGCTGCTG GTACTAGTTA  
 CTGGGTGGTG GCCCTCCATT CGACCGGTCT TTGAATAGAC ACAGACAGG TAACATCTGA CAGATACTGA CTAATAATCG CCGACGACG CATGATCAAT  
 5201 GCTAATAGC TCTGTATCTG GCGACCCCTG GGTGGAATG ACAGTCTCG AACCCCGG CCAACCCCTG GGAACGCTC CAGGACTTC GGGGGCGGT  
 CGATTGATCG AGACATAGAC CGCCTGGGCA CCACCTTGAC TGCTCAAGC TTGTGGGCG GCTTGGGAC CCTCTGACG GTCCCTGAG GTCCCGGCAA  
 5301 TTTGTGCCC GACCTGAGTC CCAATATCC GATCGTTAG GACTCTTGG TGACCCCCC TTAGAGGAG GATATGTGT TCTGTAGGA GACGAAAC  
 AAACACCGG CTGACTCAG GATTTTAGG CTAGCAATC CTGAGAAC ACCTGGGGG AATCTCTCC CTATACACCA AGACCATCT CTGCTCTTGG  
 5401 TAAACAGTT CCGCCTCCG TCTGAATTT TGTCTTCTG TTGGGACCG AGCGGCGCG CGCGTCTGT CTGCTGACG ATCGTCTGT GTTGTCTGT  
 ATTTTGTCAA GGGCGGAGG AGACTTAAA ACAGAACCA AACCTGGT TCGGCGCGG CTACCATCC CTTAAGTTG ACCTAGGTC ACTGGAAGA TGTGAGCGG  
 5501 TCTGACTGT TTTCTGTATT TGTCTGAAA TATGGGCGG GGTAGACTG TTACCATCC AATGGTGGG GAATCAAC TGGATCCAG TGACCTTCT ACAGTCTGCC  
 AGACTGACAC AAGACATAA ACAGCTTTT ATACCCGGG CCGATCTGAC AATGTGAGG GAATCAAC TGGATCCAG TGACCTTCT ACAGTCTGCC  
 5601 ATCGCTCACA ACCAGTCGGT AGATGTCAAG AAGAGACGTT GGGTTACCT CTGCTCTGCA GAATGCCAA CTTTAACT CCGATGCGG CAGAGCGGCA  
 TAGCGAGTGT TGGTCAGCCA TCTACAGTTT AGATCAAGT CTTTACCT GCGCGCATG GACACCCAGA CCAAGTCCC TACATCTGA CTTGCGGAGC  
 5701 CCTTTAACCG AGACCTCATC ACCCAGTTA ACCCAGTTA AGATCAAGT CTTTACCT GCGCGCATG GACACCCAGA CCAAGTCCC TACATCTGA CTTGCGGAGC  
 GGAATTTGG TCTGAGTAG TGGTCCAT TCTAGTTCCA GAAAGTGA CCGGCGTAC CTGTGGGTCT GTCCAGGGG ATGTAGCAT GGACCTCTCG  
 5801 CTTGGCTTTT GACCCCTC CTTGGGTCAA GCGCTTTCTA CACCTTAAG CTCGCCCTC TCTTCTCCA TCCGCCCTCT CTCTCCCCCT TGAACCTCT  
 GAACGAAA CTGGGGGAG GAGCCAGTT CCGGAACAT GTGGATTCG GAGGAGAGG AGAGAGAGT AGCGGGGA GAGAGGGGA ACTTGGAGGA  
 5901 CGTTCGACCC CGCTCGATC CTCCTTTAT CAGCCCTCA CTCCTTCT AGCGCCCC ATATGGCCAT ATAGATCTT ATATGGGCA CCCCCGCC  
 GCAAGCTGG GCGAGCTAG GAGGGAATA GGTGGGAGT GAGGAAGA TCCGGGGG TATACCGGTA TACTCTAGAA TATACCCGT GGGGGGGGG

Figura 18 (3 de 5)



6001 TTGTAAACTT CCTGAGCCT GACATGACAA GAGTACTAA CAGCCCTCT CTCACACTC ACTTACAGGC TCTTACTTFA GTCCAGCAGC AAGTCTGGAG  
 AACATTGAA GGGACTGGGA CTGTACTGTT CTCAATGAT GTCCGGAGA GAGGTTCAG TGAATCTCCG AGAGATGAAT CAGTCTGTGC TTCAGACCTC  
 ACTCTGGCG GCGACCTACC AAGACAACCT GCGACGACCG GTGGTACTTC ACCCTTACG AGTGGCGAC ACAGTGTGG TCCGCCGACA CCAGACTAAG  
 TGGAGACCG CCGTGGATGG TTCTTGTGA CCTGGCTGG CACCATGGAG TGGGAATGG TCAGCGCTG TGTACACCC AGCGGCTGT GGTCTGATTC  
 Pml I -----

6201 AACTAGAAC CTCGCTGAA AGGACCTTAC ACAGTCTGC TGAACACCC CACCGCCCTC AAGTAGAGC GCATCGCAGC TTGATACAC GCCGCCACG  
 TTGGATCTG GAGCGACCTT TCCTGGATG TGTGAGAGC ACTGGGGG GTGGCGAG TATCATCTGC CGTAGCTGC AACTATATG CCGCGGTGC  
 -----

6301 TGAAGCTGC CGACCCCGG GGTGGACAT CCTGTAGACT CCTAGCTC TCCAGTAC TCCCTACTG CTCCCTTAG CCTTCTCTT GCATGCGAG  
 ACTTCGAG GCTGGGGCC CCACCTGGA GAGATCTGA CGGTACCGAG AGGTCACTG ACGGATGAC GAGGGGATC GCGAGAGGA COTACGTCTC  
 VH -----

6401 GTGAGCTGC AGATCTAG GCGAGGCTC GTGAGCTG GTGAGCTC CAGATCTC TGTGAGCT TGTGAGCT CAGATCTC TGTGAGCT TGTGAGCT  
 CACTTGGAG TCTGAGTGC CACTTGGAG CACTTGGAG CACTTGGAG CACTTGGAG CACTTGGAG CACTTGGAG CACTTGGAG CACTTGGAG CACTTGGAG  
 VH -----

6501 CCTGGCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC  
 GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC GAGATCTGC  
 VH -----

6601 CAGATCTGC AGATCTAG CAGATCTGC CAGATCTGC CAGATCTGC CAGATCTGC CAGATCTGC CAGATCTGC CAGATCTGC CAGATCTGC  
 GTGATCTGC TGTGATCT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT  
 Enlazador de serina-glicina (G4S)3 -----

6701 GGTATCTAG GTGATCTA TGTATCTA TGTATCTA TGTATCTA TGTATCTA TGTATCTA TGTATCTA TGTATCTA TGTATCTA  
 CCATCTATG CACTATATG ATCATCTG ATCATCTG ATCATCTG ATCATCTG ATCATCTG ATCATCTG ATCATCTG ATCATCTG ATCATCTG  
 VL -----

Enlazador de serina-glicina (G4S)3

6801 GAGTGTATC TGACATGAG GTACCCCAT CTCACTCTC CTGCGCTG TACCGGAG AGAGGTGAC TATGAGCTC AATTCAGTC AGATCTGCT  
 CTCACCTAG ACTGTACT GAGTGGTCA GAGTGGTCA GAGTGGTCA GAGTGGTCA GAGTGGTCA GAGTGGTCA GAGTGGTCA GAGTGGTCA GAGTGGTCA  
 VL -----

6901 GAGATCTA AGCGAACA ACCATCTGC TGTATCTA GAGATCTC GAGATCTC GAGATCTC GAGATCTC GAGATCTC GAGATCTC  
 GTTGTCTCT TGGCTTCT TGTCTATC ACCATCTC GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT GGTCTTGT  
 VL -----

Fig. 18 (4 de 5)

7001	<p>-----</p> <p>GTCCCTGATC GCTTCACAGG CAGTGGATCT GGGACAGATT TCACCTCAC CATCAGCACT GTCCAGGCTG AAGACCTGGC AGTTTATTAC TGCCAGCAAT CAGGCACTAG CGAAGTGTCC GTACACCTAGA CCCTGTCTAA AGTGAGGTG GTACTCGTCA CAGTCCGAC TTCTGGACCG TCAATAATG ACGGTCTGTTA</p> <p>-----</p> <p>VL</p> <p>-----</p> <p>Dominio transmembrana de CD8</p> <p>-----</p>
7101	<p>-----</p> <p>CTTATAATCT ACTCAGGTTTC GGTCCCTGGGA CCAAGCTGGA GATCAAAACGG GCGCGGCAC CCACCAACAC GCCAGCGCCG CGACCAACAA CCCCAGCGCC GAATATTAGA TGAGTGGCAAG CCAGGACGCT GTTTCGACCT CTAGTTTGCC GCGCGCGCG GTGTGCTGTG CGGTCCGCGG GCTGTGGTTT GGGCGCGCGG</p> <p>-----</p> <p>Dominio transmembrana de CD8</p> <p>-----</p>
7201	<p>CACGATCGCG TCGCAGCCCC TGTCCCTGCG OCCAGAGCGG TCGCGGCCAG CGCGGGGGG CGCAGTGCAC ACGAGGGGGG TGGACTTCGC CTGTGATATC GTGCTAGCGC ACGTTCGGGG ACAGGGGAGC GGTCTCCGC ACGCGGGTC CCGCCCCCG GGTTCACGTG TGCTCCCCG ACCTGAAGCG GACACTATAG</p> <p>-----</p> <p>Dominio transmembrana de CD8</p> <p>-----</p>
7301	<p>-----</p> <p>Dominio intracelular de cadena zeta de CD3</p> <p>-----</p> <p>TACATCTGG CGCCCTTGCG CGGGACTTGT GGGGTCTTTC TCCTCTCACT GGTATCACCC CTTTACTGCA ACCACAGAGT GAAGTTCAGC AGGACGGCAG ATGTAGACCC GCGGGAACCG GCCTGAACA CCCCAGGAAG AGGACAGTGA CCAATAGTGG GAATGACGT TGGTGTCTCA CTTCAAGTCG TCCTCGCGTC</p> <p>-----</p> <p>Dominio intracelular de cadena zeta de CD3</p> <p>-----</p>
7401	<p>AGCCCCCGC GTACCAGCAG GGCAGAACCC AGCTCTATAA CGAGCTCAAT CTAGGACGAA GAGAGGAGTA CCATGTTTGG GACAACAGAC GTGCCCGGGA TCGGGGGGCG CATGGTCGTC CCGGTCTTGG TCGAGATATT GCTCGAGTTA GATCCTGCTT CTCTCTCAT GCTACAAAC CTGTTCTCTG CAOCGGCCCT</p> <p>-----</p> <p>Dominio intracelular de cadena zeta de CD3</p> <p>-----</p>
7501	<p>CCCTGAGATG GGGGGAAGC CGAGAAGGAA GAAACCTCAG GAAGCCTGT ACAATGAAT GCAGAAAGAT AAGATGCGG AGGCCTACAG TGAGATTGGG GGGACTCTAC CCCCCTTTCG GCTCTTCTCTT CTGGGAGTC CTTCCGGACA TGTACTTGA CGTCTTTCTA TTCTACCGCC TCOGGATGTC ACTCTAACCC</p> <p>-----</p> <p>Dominio intracelular de cadena zeta de CD3</p> <p>-----</p>
7601	<p>ATGAAGGGG AGCGCGGAG GGCAGGGG CACGATGGCC TTACAGGG TCTCAGTACA GCCACCAAG ACACCTACGA CGCCCTCAC ATGACGGCC TACTTCCGC TCGCGGCTC CCGTTCGCC GTGCTACCGG AAATGTCCC AGATCATGT CGGTGGTTCC TGTGATGCT GCGGGAAGTG TACGTCCGGG</p> <p>-----</p> <p>Dominio intracelular de cadena zeta de CD3</p> <p>-----</p> <p>XhoI</p> <p>-----</p>
7701	<p>TGCCCCCTCG CTAACAGCCA CTCGAG ACGGGGGAGC GATTGTCGGT GAGCTC</p>

Figura 18 (5 de 5)



BamHI  
 1 GGATCCGGAT TAGTCCCAAT TGTAAAGAC AGGATATACAG TGGTCCAGGC TCTAGTTTGT ACTCAACAAT ATCACCAGCT GAAGCCTATA GAGTACGAGC  
 CTTAGGCCCTA ATCAGGTTAA ACAATTTCTG TCCATATAGTC ACAGAGTCCG AGATCAAAAC TGAGTTGTTA TAGTGTGCGA CTTCGGATAT CTCATGCTTG  
 CATAGATAAA ATAAAGATTT TTATTAGTGC TCCAGAAAAA GGGGGGATG AAAGACCCCA CCTGTAGGTT TGGCAAGCTA CTCTAAGTAA CGCCATTTTG  
 GTATCTATTT TATTTTCTAA AATAATCAG AGGCTTTTTC CCCCCTTAC TTCTGGGGT GGACATCCAA ACCGTCGAT CGAATTCATT GCGGTAAAC  
 CAAGGCATGG AAAAATACAT AACTGAGAT AGAGAAGTTC AGATCAAGT TCGATCAAGT TGAACAGCT GAATATGGC CAAACAGGAT ATCTGTGTGA  
 GTCCGTAC TTATTATGTA TCTCTTCAAG TCTAGTTCA TGCCTTCTCT ACCTTGCGA TGTATACCGG TTCTGTCTTA TAGACACCAT  
 AGCAGTTCTT GCCCGGCTC AGGGCAAGA ACAGATGGA CAGCTGATA TGGGCCAAAC AGGATATCTG TGGTAAGCAG TTCTGCCCC GGCTCAGGCG  
 TCGTCAAGGA CGGGCCGAG TCCCGTTCT TGTCTACCTT GTGCACTAT ACCCGTTTG TCTATAGAC ACCATCTGTC AAGGACGGGG CCGAGTCCCG  
 CAAGAACAGA TGGTCCCCAG ATGGGTCCA GCCCTCAGCA GTTCTAGAG AACATCAGA TGTTCACAG GTGCCCAAG GACCTGAAT GACCTGTGTC  
 GTTCTGTCT ACCAGGGTC TACGCCAGT CCGGAGTCTG CAAAGATCTC TTGTAGTCT ACAAGGTTC CACGGGTTTC CAGGACTTA CTGGGACACG  
 CTTATTGTA CTAACCAATC AGTTCGCTTC TCGCTTCTGT TCGGGGCTG CAGCTCAATA AGAGCCAC AACCCCTAC TCGGGGCGGC  
 GAATAAACTT GATTGGTTAG TCAAGCGAAG CGCCGGGTA CCGGTATC CAATAACCC TCTTGAGTT GCATCCGACT TGTGCTCTG GAGGGTCTC  
 AGTCTCCGA TTGACTAGT CGCCCGGTA CCGGGCCAT GGGCACATAG GTTATTGGG AGAAGTCAA CGTAGCTGA ACACAGAGC CCTCCAGAG  
 TCAGGAGGCT AACTGACTCA CGGGGCCAT GTCTTTCAC GTAGTCTCTA CATAGTTTA TAATTAACCA AAAAAGAAAT TCATAAATG ATTTACCGC  
 CTCTGAGTGA TTGACTACCC GTACGCGGG GTCTTTCAC GTAGTCTCTA CATAGTTTA TAATTAACCA AAAAAGAAAT TCATAAATG ATTTACCGC  
 GAGACTCACT AACTGATGG CAGTGGCCC CAGAAAGTGT GTCTTTCAC GTAGTCTCTA CATAGTTTA TAATTAACCA AAAAAGAAAT TCATAAATG ATTTACCGC  
 ATAGTACTTA AGTTTACAT TGCCTTCTG AATTAACCA GTAGTCTCTA CATAGTTTA TAATTAACCA AAAAAGAAAT TCATAAATG ATTTACCGC  
 TATCATGAAT TTCAATGTA CCGAAGAAC TTTATTGTA CCTATAAGT CTACACAGT ATTTATAAG ATTTAAATTC TATCATAGAG GTAAACGAAA  
 CTACTTTTC TTTATTTC TTTTCTCTC TGTCTTCTC AATTAACCA GTAGTCTCTA CATAGTTTA TAATTAACCA AAAAAGAAAT TCATAAATG ATTTACCGC  
 GATGAAAAG AAAATAAAA AAACAGAGG ACAGAGGTA AACACACCA ACAACACCA AACAACCA CACTAACA CACTAACA CACTAACA  
 ATCTRCAT ATAGTTCAAG CTAGACTATT AGTACTCTG TAACCCAGG TGACCTGAA GTCACTGGTA GCTGCTGT TTAGCCTTC CACATCTAAG  
 TAGGATGTA TATCAAGTTC GATCTGATA TCGATGAGC ATTTGGTCCC ACTGGAATTT CAGTACCCAT CGGACGACA AATCGAAG GTGTAGATTC  
 AATTACAGTA TGAGTATCA TTTTGGTAT TGAATGATG ATGTGTGT GTGTGATGT CACTAACA CACTAACA CACTAACA CACTAACA CACTAACA  
 TAATGTCCAT ACTGATAGT AAAACCATTA TAATCACTA ACTACATGAC TACACACCA CACTAACA CACTAACA CACTAACA CACTAACA CACTAACA  
 ATGGGTGT GTGAATGT GTATGATGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT  
 TACCCACACA CACTTACACA CATATACACA CACACACACT CACACACACT CACACACACT CACACACACT CACACACACT CACACACACT CACACACACT  
 GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT GTGTGTGT  
 CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACT TATATAGATA CCATCACTCT CGGTTCGAG GCGAGTCCA CAGTCCAACC  
 EcorI  
 1401 TTTTGGAGC AGAGTCTTTC ACTTAGCTTG GAATTCACGT GCGGTCTGTT TACAAGTCTG TGACTGGGA AACCTGGGG TTACCCAAT TAATCGCTT  
 AAAAATCTG TCTCAGAAAG TGAATCGAAC CTTAAGTGAC CCGGACGAAA AGGATCGCAT CGATCGCCCT TCCCAACAGT TGGCGAGCTT GAGCGGAA  
 GCAGCACATC CCCCTTTTCG CAGCTGGCGT AATAGCGAAG AGGCCCGAC CGATCGCCCT TCCCAACAGT TGGCGAGCTT GAGCGGAA TGGCGGCTGA  
 CBTCTGTAG GGGGAAAGCG GTCCACCGCA TTATCGCTTC TCCGGGCTG TCGGCGGCTG GCTAGCGGA AGGTTGTCA ACCTGCGA CTTACCGCTT ACCGCGACT  
 TCGGTATTT TCTCTTACG CATCTGTGG GTATTTCACA CCGCATATGG TGCATCTCA GTACATCTG CTCTGATGCC GCATAGTAA GCCAGCCCCG  
 ACGCCATAA AGAGGAATGC GTAGACACGC CATAAAGTGT GCGGTATACC ACCTGAGAGT CATGTAGAG GAGACTAGG CGTATCAAT CCGTCCGGC  
 ACACCCGCA ACACCGCTG ACAGCCCTG ACAGCCCTG CTGCTCCGG CATCGCTTA CAGACAAGT GTACCCGCT GTCCGAGCT GCGGAGCTG CATGTCTAG  
 TGTGGCGGT TGTGGCGAC TGGCGGCG TGGCGGCG ATGACGAAAG GGCCTCTGA TACGCTATTT TTTATAGTT AATGTCTGA TAATAATGT TCTTAGACG  
 AGGTTTTC CACTATACC GAACGCGCG ATGACGAAAG GGCCTCTGA TACGCTATTT TTTATAGTT AATGTCTGA TAATAATGT TCTTAGACG  
 TCCAAAGTG GCAGTATGG CTTTGGCGC TACTGCTTC CCGGAGACT ATTCGATAA AAATATCCAA TGTATCCGT CATGAGCAA TAACCTGTG  
 TCAGTGGCA CTTTTCGGG AAATGTGGC GGAACCCCTA TTTGTTTAT TTTGTTTAT TTTGTTTAT TTTGTTTAT TTTGTTTAT TTTGTTTAT TTTGTTTAT  
 AGTCCACCGT GAAAGCCCG TTTACACGCG CTTTGGGAT AAACATAA AAAGATTAAT CTAAGTTTAT ACATAGGGA GTACTCTGT ATTGGACTA  
 AAATGCTTCA ATAATATGA AAAGGAAGA GTATGATAT TCAACATTC CGTGTGCGC TTATCCCTT TTTGCGGCA TTTTGCCTC CTGTTTTCG  
 TTTACGAAGT TATTATACT TTTTCTTCT CATACTCATA AGTTGTAAAG GCACAGCGG AATAAGGGA AAAACGCGT AAAACGGAAG GACAAAAACG

Figura 19 (1 de 6)



2101 TCACCCAGAA AGCTGTGTGA AAGTAAAGAA TGCTGAAGAT CAGTTGGGTG CACGAGTGGG TTACATCGAA CTGGATCTCA ACAGCGGTAA GATCCTTGAG  
 AGTGGGTCTT TGCAGCACT TTCAATTTCT ACGATTTCTA GTCAACCCAC GTGCTACCC AATGTAGCTT GACCTAGAGT TGTGCGCAAT CTAGGAACTC  
 AGTTTTCGCC CCGAAGAACG TTTTCCCAATG ATGAGCACTT TTAAGTTCT GCTATGTGGC GCGGTATTGA CCGGTATTGA CGCGGGCAA GAGCAACTCG  
 TCAAAAGCGG GGTCTTCTTC AAAAGTTAC TACTGTGAA AATTTAAGA ACATTAAGA ACATTAAGA ACATTAAGA ACATTAAGA ACATTAAGA ACATTAAGA  
 GTGCGCGCAT ACATTTCT CAGATGACT TGGTTGAGTA CTCACCACTA CTCACCACTA CTCACCACTA CTCACCACTA CTCACCACTA CTCACCACTA  
 CAGCGGGGTA TGTGAAGA GTCTTACTGA ACCAATCTAT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT  
 TGCCATPACC ATGAGTGATA ACATGCGGC CAATTTACTT CTGACACGA TCGGAGGACC GAAAGAGCTA ACCGCTTTTT TGCACAACT GGGGATCAT  
 ACGGTATTGG TACTCACTAT TGTGAGCGCG GTTGAATGAA GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT  
 GTAACTCGCC TGTATCGTTG GGAACCGGAG CTGATGAGG CAAATCCAA CAAATCCAA CAAATCCAA CAAATCCAA CAAATCCAA CAAATCCAA  
 CAAATGAGCG AACTAGCAAC CTTGCGCCTC GACTTACTTC GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT GATGTGTGAGT  
 AACTATTAAAC TGGCGAACTA CTACTCTAGT GAATGAGATC GAAGGCGGT TGTAAATTA TGTAAATTA TGTAAATTA TGTAAATTA TGTAAATTA TGTAAATTA  
 TTGATAATTG ACCGCTTGAT GTGATAATTG GTGATAATTG GTGATAATTG GTGATAATTG GTGATAATTG GTGATAATTG GTGATAATTG GTGATAATTG GTGATAATTG  
 TCGGGTGGC TGTATTATTG CTGATAATTG GACTATTAG ACTTCGGCC CTGCGACCA CTGCGACCA CTGCGACCA CTGCGACCA CTGCGACCA CTGCGACCA  
 AGGCGGACG ACCAATAAC GACTATTAG GACTATTAG GACTATTAG GACTATTAG GACTATTAG GACTATTAG GACTATTAG GACTATTAG GACTATTAG GACTATTAG  
 GTAGTTATCT ACACGACGG GAGTCAGGCA ACTATGGATG ACAGATCGCT GAGATAGGAT TGTCTAGCGA TGTCTAGCGA TGTCTAGCGA TGTCTAGCGA TGTCTAGCGA  
 CATCAATAGA TGTGCTGCC CTGACTCGT TGTGACTTAC TGTGACTTAC TGTGACTTAC TGTGACTTAC TGTGACTTAC TGTGACTTAC TGTGACTTAC TGTGACTTAC  
 ACCAAGTTA CTCAATATA CTCTAGATG ATTTAAATCT TCAATTTAA TCAATTTAA TCAATTTAA TCAATTTAA TCAATTTAA TCAATTTAA TCAATTTAA TCAATTTAA  
 TGGTTCAAT GATTTTCTG TCCACTGAGC GTGAGACCC AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA  
 CCCTTAAGT GATTTTCTG TCCACTGAGC GTGAGACCC AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA AGTAAATTA  
 GGGAAATGCA CTCAAAAGCA AGGTGACTCG CAGTCTGGG CATCTTTCT AGTTCTCTAG AAGAACTCTA AAGAACTCTA AAGAACTCTA AAGAACTCTA AAGAACTCTA  
 CAAACAAA AACCACGCT ACCAGCGTG CAGTCTGGG CATCTTTCT AGTTCTCTAG AAGAACTCTA AAGAACTCTA AAGAACTCTA AAGAACTCTA AAGAACTCTA  
 GTTGTGTTT TGGTGGCGA TGGTGGCGC CAAACAAAC GACTATGTT CAGTCTGGG CATCTTTCT AGTTCTCTAG AAGAACTCTA AAGAACTCTA AAGAACTCTA AAGAACTCTA  
 CAAATACTGT CTTCTAGTG TAGCGTAGT TAGCGTAGT TAGCGTAGT TAGCGTAGT TAGCGTAGT TAGCGTAGT TAGCGTAGT TAGCGTAGT TAGCGTAGT TAGCGTAGT  
 GTTATGACA GGAAGATCAC ATCGGCATCA ATCGGTGGT GAAATTTCT AGATCTGTC GCGGATGAT GCGGATGAT GCGGATGAT GCGGATGAT GCGGATGAT GCGGATGAT  
 TGCTGCCAGT GCGGATAAGT CGTGTCTTAC CCGGTGGAG GCGGTGGAG GCGGTGGAG GCGGTGGAG GCGGTGGAG GCGGTGGAG GCGGTGGAG GCGGTGGAG GCGGTGGAG  
 ACGACGGTCA CCGCTATTCA GCACAGAATG GCCCAACCTG AGTTCTGCTA TCAATGAGCT TCAATGAGCT TCAATGAGCT TCAATGAGCT TCAATGAGCT TCAATGAGCT  
 CAGCCAGCT TGGGCGAAC ACCTCGCTG CTGATGATG GACTTACAC GAACTGAGT GAACTGAGT GAACTGAGT GAACTGAGT GAACTGAGT GAACTGAGT GAACTGAGT GAACTGAGT  
 ATCCGGTAAG CCGCAGGTC GGAACAGAG AGCCACGAG GAGCTTCA GAGCTTCA GAGCTTCA GAGCTTCA GAGCTTCA GAGCTTCA GAGCTTCA GAGCTTCA GAGCTTCA  
 TAGGCCATC GCGGTCCAG CTTGTCTC TCGGTGCTC CTTGAGTGG CTTGAGTGG CTTGAGTGG CTTGAGTGG CTTGAGTGG CTTGAGTGG CTTGAGTGG CTTGAGTGG CTTGAGTGG  
 ACTGAGCGT GATTTTTGT GATGCTGTC ATCAGAGCAG TCCCGCGCC AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG  
 TGAACCTGCA GCTAAAACA CTACAGCAG CCGCGCGCC AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG AGCTATGAG  
 TTTGCTACA TGTCTTTCC ACAGAAAGG ACGCAATAGG GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT  
 AAACGAGTGT ACAAGAAAG ACGCAATAGG GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT GGAATTTCT  
 AGCGCAGCA GTCAGTGAG CAGGAGCGG AAGAGCGCC AATACGAAA CCGCTCTCC CCGCTCTCC CCGCTCTCC CCGCTCTCC CCGCTCTCC CCGCTCTCC CCGCTCTCC CCGCTCTCC  
 TCGCGTGGT CAGTCACTCG CTCCTTCGCC TCTCTCGCG TTTAGCGTT TTTAGCGTT TTTAGCGTT TTTAGCGTT TTTAGCGTT TTTAGCGTT TTTAGCGTT TTTAGCGTT TTTAGCGTT  
 GTTCCCGAC TGAAGCGG GAGTGAGCG GAGTGAGCG GAGTGAGCG GAGTGAGCG GAGTGAGCG GAGTGAGCG GAGTGAGCG GAGTGAGCG GAGTGAGCG GAGTGAGCG GAGTGAGCG  
 CAAAGGCTG ACCTTTGCGC GGTCTCTCG GGTCTCTCG GGTCTCTCG GGTCTCTCG GGTCTCTCG GGTCTCTCG GGTCTCTCG GGTCTCTCG GGTCTCTCG GGTCTCTCG GGTCTCTCG  
 ATGTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG GATTTGTTG  
 TACAACAC CTTAACACT GCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT  
 AAACCTCAAT ATATAAGCA TTTGACTTGT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT TCTTATGTT  
 TTTGAGTTA TATTTCTGT AAATGAAAC AGATACGGA TCCCGCGCC CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT  
 AATGCACAGA TGTTTTATT TCATAAGGT TCTAATGTC ATGATGTC ATGATGTC ATGATGTC ATGATGTC ATGATGTC ATGATGTC ATGATGTC ATGATGTC ATGATGTC ATGATGTC ATGATGTC  
 TTACGTGTCT ACAAATAA AGTATCCCA AAGTTACAG TACTTACAG TACTTACAG TACTTACAG TACTTACAG TACTTACAG TACTTACAG TACTTACAG TACTTACAG TACTTACAG TACTTACAG

Figura 19 (2 de 6)

4301 AATTACTTAG AGTTTCTGTC ATTAAACGTTT CTTCTCTCAG TTGACAAACAT AAATCGGCTG CTGAGCAAGC CAGTTTGCAAT CTGTCCAGGAT CAATTTCCTCA  
 4401 TTAATGAATC TCAAGACAG TAATTGCAAA GGAAGGAGTC AACTGTGTGA TTATCGGAGC GACTCGTTGAG GTCAAAACQTA GACAGTCTTA GTTAAAGGGT  
 4501 TTATGCCAGT CATATTAAT ACTAGTCAAT TAGTTGATTT TATTTTGA TATATCATG TGAATGAAG ACCCCACCTG TAGTTTGGC AAGCTAGCTT  
 4601 AATACGGTCA GTATAATTA TATCAGTTA ATCAACTAAA ATCAAAATCT GTATATGTAT CATTACTTTC TGSGGTGGAC ATCCAAACCG TTCGATCGAA  
 4701 AAGTAAACGC ATTTTGAAG GCATGGAATA ATCAATACT GAGAAAGAA AGTTTCAGAT TTTCCAGTCC GTTCCAGTCC TGTCTACTT TGTGACTTA TACCCGGTTT  
 4801 TTCAATTCGG TAAACGTTT CTTACCTTTT TATGATATGA CCAAGAACAG TACGAACAGC TGAATATGGG CCAAAACAGGA TATCTGTGTT AAGCAGTTCC  
 4901 CAGGATATCT GTGTGAAGCA GTTCTCTGCC CGGCTCAGGG GGTTCCTGTC GGTTCCTGTC ACTATATCCC GGTTCGCTT ATAGACACCA TTCTGTAAGG  
 5001 TGCCCGGGCT CAGGCGCAAG AACAGATGGT CCCCAGATGC GGTCCAGCCC TCAGCAGTTT CACAGTATGC ATCAGATGTT TCCAGGCTG CCCAAGGACC  
 5101 ACGGGGCCGA GTCCCGGTTT TTGTCTACA GGGGTCTACG CCAGTCGCGG AGTCGTCAA GAICTCTTGG TACTCTACAA AGGTCCACAG GGTTCCTGG  
 5201 TGAATGACC CTGTGCCCTTA TTGTAACTAA CCAATCAGTT CGCTTCTCGC TTCTGTTCGC CGCCTTATGC TCCCCGAGCT CAATAAAGA GCCCAACACC  
 5301 ACTTTACTGG GACAGGGAAT AAATTTGAT GTTAGTCAA GCGAAGAGC AGACAAGCG CGCAATATGC AGGAGTCTGA GTTATTTCT CGGTTGTTGG  
 5401 CCTTACTCGG GCGCCAGTC CTCCGATTA CTGAGTCGCC CGGTAACCG TGTATCCAAAT AAACCTCTT GCAGTTGCTAT CCGACTTGT CCGCTCTGT  
 5501 GAGTGAAGC CCGCGGTCTAG GAGGCTAAT GACTCAGCG GCGCATGGG ACATAGGTTA TTTGGGAGAA CFTCAACGTA GGTGAACAC CAGAGGACA  
 5601 TCCTTGGGAG GGTCTCTCTT GAGTGAATGA CTACCCGTC CCGGGGTCTT TCAATTTGG GGTCTGTCG GGTTCGGAG ACCCTGCCC AGGACACACC  
 5701 AGGAACCTC CCAGAGGAGA CTCACTAAT GATGGGAGT CCGCCCGAGA AAGTAAACCC CCGAGCAGCG CCTAGCCCTC TGSGGACGGG TCCCTGGTGG  
 5801 GACCCACCC CCGGAGGTTA GCTGGCCAGC AACTTATCTG TGTCTCTCGG ATTTGCTAGT GTCATATGCT CTAATAATACG CTAATAATACG CATGATCAAT  
 5901 CTGGGTGGTG GCCCTCCATT CGACCCGGTCG TTGAATAGAC ACAGACAGCG TACTTGGGAG AATCTCTCTC TTAGAGGAGG GATATGTGGT TCTGGTAGGA GACGAGAACC  
 6001 GCTAATAGC TCTGTATCTG CCGACCCCGT GGTGGAACAG ACAGTTTCGG AACAACCCCG CGCAACCTCG GAGACGCTC CAGGACTTC GGGGGCCGTT  
 6101 CGATTGATCG AGACATAGAC CGCTTGGGCA CCACCTTTGAC TGCTCAAGCC TTGTGGGCGG CGCTTGGGAG CACTCTGCAAG GTCCCTGAAG CCCCAGGCAA  
 6201 TTTGTGGCC GACCTGAGTC CTAAATCCC GATCTTTAG GACTCTTTGG TGCACCCGCC ACCTGCGGCC TTAGAGGAGG GATATGTGGT TCTGGTAGGA GACGAGAACC  
 6301 TAAAACAGTT CCCGCTCCG TCTGAATTT TGTCTTCCGT TTGGHACCGA AGCCGCGCGG CGCTCTTGT CTGCTGCAAG ATCTCTCTCT GTTGTCTCTG  
 6401 AATTTGTCAA GGGCGGAGC AGACTTAAA ACGAAAGCCA AACCTTGGCT TCGGCGCGCG CCGCAGAACCA GACGACGCTG TAGCAAGACA CAACAGAGAC  
 6501 TCTGACTGT TTTCTGTATTT TGTCTGAAA TATGGGCGCG GGTAGACTG TTACCACTCC CTTAAGTTTG ACCTTAGTCT ACTGGAAGA TGTCCAGCGG  
 6601 AGACTGACAC AAAGACATTA ACAGCTTTT ATACCCGGG CCGATCTGAC AATGGTGAGG GAATCAAC TGGAAATCCAG TGACCTTCT ACAGCTCGCC  
 6701 ATCGCTCACA ACCAGTCGGT AGATGTCAAG AAGAGACGTT GGGTTACCTT CTGCTCTGCA GAATGGCCAA CTTTAAAGT TGGATGGCCG CAGACGGGA  
 6801 TAGCGAGTGT TGTGAGCCA TCTACAGTCT ACCCAGGTTA AGATCAAGTT CTTTTCACCT GGCAGCGCAT GACACCCAGA CCAAGTCCCT TACATCTGA CCTGGGAAGC  
 6901 CCTTTAACC AGACTCATC ACCAGGTTA TCTAGTTTGA GAAATGGA CCGGCGGTAC CTGTGGGTTCT GGTCCAGGG ATGTAGCACT GACCTCTCTG  
 7001 GGAATTTGG CTGGAGTAG TGGTCCAAAT TCTAGTTTGA CACCTTAAAG CTCGCTCC CTTCTCTCCA TCCGCCCCGT TCCGCCCCGT TGAACCTCTT  
 7101 GAACCGAAA CTGGGGGAG GGACCCAGTT CCGGAACAT GTGGATTCG GAGCGGAGG AGAAGAGGT AGCGGGGGA GAGAGGGGA ACTTGGAGGA  
 7201 CGTTCGACC CGCTCTGAT CTCCCTTAT CACGCCCTCA CTCCTCTCT AGGCGCCCC ATATGGCCAT ATGAGATCTT ATATGGGGA CCCCAGCCCC  
 7301 GCAAGCTGG GCGGAGCTAG GAGGGAATA GTTCCGGAGT GAGGAAGA TCCCGGGGG TATACCGGTA TATACCCCTT GGGGCGGGG  
 7401 TTGTAAACTT CCGTGACCTT GACATGACA GAGTTACTAA CAGCCCTCT CTCCAAGCTC ACTATAGGC TCTCTACTTA AGTCCAGCAC AAGTCTGGAG  
 7501 AACATTTGAA GGGACTGGGA CTGTACTGTT CTCAATGATT GTCCGGGAGA GAGTTTCGAG TGAATGTCCG AGAGATGAAT CAGGTCTGTC TTCAGACCTC

Figura 19 (3 de 6)



6101 ACCTCTGGG GCAGCCTACC AAGAACAAC GTGCTACCTC ACCCTTACCG AGTGGGGAC ACAGTGTGG TCCGCCGACA CCAGACTAAG  
TGGAGACCGC CGTCGGATGG TTCTTGTGTA CCTGGCTGGC CACCATGGAG TGGGAATGGC TCAGCCGCTG TGTACACCC AGGGGCTGT GTCTGTATTC  
PmlI ----

6201 AACCTAGAAC CTCGCTGGAA AGGACCTTAC ACAGTCCTGC TGACCACCC CACCGCCCTC AAAGTAGACG GCATCGCAGC TTGGATACAC GCGGCCACG  
TTGGATCTTG GAGCGACCTT TCCTGGAATG TGTGAGACG ACTGGTGGGG GTGGCGGGAG TTTCATCTGC CGTAGCGTCG AACCTATGTG CCGCGGGTGC  
VH ---

Lider de CD8

-----

NcoI

-----

6301 TGAAGGCTGC CGACCCCGGG GGTGGACCAT CCTCTAGACT GCCATGGCTC TCCAGTGAC TGCCCTACTG CTTCOCCTAG CGCTTCTCTT GCATGCAGAG  
ACTTCCGAGC GCTGGGGGCC CCACCTGGTA GGAGATCTGA CGGTACCGAG AGGTCTACTG ACGGGATGAC GAAGGGATC GCGAAGAGGA CGTACGTCTC  
VH

6401 CTCAGCTGC AGAGTCAGG GGCAGCTTC GTGACCCCTG GAGGTCCCT CAAAGTCTCC TGTGACCCCT CTGGATTCAC TTTCAGTAGC TATGCCATCT  
CACTTCGAGC TCCTCACTCC CCTCCGAAG CACTTCGGAC CTCCAGGA GTTTCAGAGG ACACCTGGG GACCTAAGTG AAGTCATCG ATACGGTACA  
VH

6501 CCTGGCTGC CCTAGTCCG GAGATCAGC TGGATGGGT CGCAACCATT ACAGTCTCTG GTGGTACAT CTTCATCTCT GACATGTC AGGACCATT  
GGACCCAGC GACTCAGC CTCTACTCG ACCTCACCA GCGTTGGTAA TGTCAAGAC CACCAATGTA GAAGATAAGA CIGTCACAGC TCCTGCTAA  
VH

6601 CACCATTTCC ACAGACAATG CCAAGAACAC CCTGCRCCTG CAATGGGA GTCTGAGTTC TGGGACAG GCCATGTATT ACTGTCCAG GAGGGATTT  
GTGGTAAAG TCTCTGTTAC GGTTCGTGTG GGACGTGGAG GTTTACCGT CAGACTCCAG ACCCTGTGC CGGTAGATAA TGACAGTTC GTGCCCTAAA  
Enlazador de glicina-serina (G4S)3  
-----

VH

-----

VL

6701 GGTAACTACG GTCATTAATA TGCTATGGAC TACTGGGCG AAGGACAC GGTACACGTC TCCTCAGCTG GAGGTGATC AGGTGGAGT GGATCTGCTG  
CCATTGATGC CACTAATGAT AGGATACCTG ATGACCCCG TTCCCTGCTG CAGTGGCAG AGGATCCAC CTCCACCTAG TCCACCTCCA CTTAGACCA

Figura 19 (4 de 6)

----- Enlazador de glicina-serina (64S) 3 -----	
6801	GAGTGGATC TGACATTGAG CTCACCCAGT CTCATCTCTC CTTGGCTGG TGACGAGGAG AGAAGTCAAC TATGACTGTC AATCCAGTC AGACTCTGCT CTCCACCTAG ACTGTAACTC GAGTGGGTCA GAGGTAGGAG GGACGGACAC AGTGGTCTCT TCTTCCAGTG ATACTCGAGG TTATGGTCAG TCTCAGACGA VL
6901	CHACAGTACA AOCCTGAAGA ACCAGTTGGC TTGGTACCAG CAAAACCCAG GACAGTCTCC TGAACCTCTG ATCTACTGGG CATCCACTAG GCAATCTGGA GTGTCTCATCT TGGGCTTTCT TGGTCAACCG AACCATGGTC GTTTTGGTC CTCTCAGAGG ACTTGACGAC TAGATGACCC GTAGTGATC CGTTAGACCT VL
7001	GTCCCTGATC GTTTCACAGG CAGTGGATCT GGGACAGATT TCACTCTCAC CATCAGAGT GTGCAGGCTG AAGACTGGC AGTTTATTAC TGCCAGCAAT CAGGGACTAG CGAAGTCTCC GTCACTAGA CCCTCTCTAA AGTGAGATG GTAGTCTGTA CAGTCCGAC TTCTGGACCG TCAATAATG ACGTCTGTTA VL
----- NotI -----	
7101	CTTATAATCT ACTCACGTTT GGTCTGGGA CCAAGCTGGA GATCAAAACGG GCGGCGGCAA TTGAAGTTAT GTATCTCTCT CTTACCTAG ACAATGAGAA GAATATTAGA TGAGTGCAAG CCAGGACCTT GGTTCGACCT CTAGTTTGGC CGCGGGCGCTT AACTTCAATA CATAGGAGGA GGAATGGATC TGTACTCTT Dominios transmembrana + intracelular de CD28 (-TERMINACIÓN)
7201	GAGCAATGA ACCATTATCC ATGTGAAAGG GAAACACCTT TGTCCAAGTC CCGTATTCC CGGACCTTCT AAGCCCTTTT GGTGCTGGT GGTGGTTGGT CTCGTTACCT TGSTAAATAGG TACACTTTC CTUUTGTGAA ACAGTTCAG GGGATAAAGG GCCTGGAAGA TTCGGGAAAA CCCACGACCA CCACCAACCA Dominios transmembrana + intracelular de CD28 (-TERMINACIÓN)
7301	GGAGTCTGG CTGTCTATAG CTGTCTATAG ACAGTGGCCT TTATTTATTT CTGGGTGAGG AGTAAGAGGA GCAGGCTCT GCACAGTGAC TACATGAACA CCTCAGGACC GAACGATATC GAACGATATC TGTCAACCGA AATAATAAA GACCCACTCC TCATTCTCT CTGTCGAGGA CGTGTCACTG ATGTACTTCT Dominios transmembrana + intracelular de CD28 (-TERMINACIÓN)
----- Dominio intracelular de cadena zeta de CD3 -----	
7401	TGACTCCCG CGGCCCCGG CCCACCGCA AGCAATTACCA GCCCTATGCC CCACCACGG ACTTCGCAGC CTATCCTCC AGAGTGAAGT TCACGAGGAG ACTGAGGGGC GCGGGGGCC GGGTGGGCGT TCGTAATGGT CGGATACGG GGTGGTGCG TGAAGCGTCG GATAGCGAGG TCTCACTTCA AGTCTCTCTC
----- Dominio intracelular de cadena zeta de CD3 -----	
7501	CGCAGAGCC CGCGGTACC AGCAGGGCCA GAACAGCTC TATAACGAGC TCAATCTAGG ACAGAGAGG GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGAGGTGGC GGCTCTCGG GGGCGCATGG TCGTCCCGGT CTGTGCTGAG ATATGCTCG AGTAGATCC TGCTTCTCTC CTCATGCTAC AAAACCTGTT CTCTGCACCG Dominio intracelular de cadena zeta de CD3
----- Dominio intracelular de cadena zeta de CD3 -----	
7601	CGGACCTTG AGATGGGGG AAAGCCGAGA AGGAGAACC CTCAGGAAG CTTGTACAT GAACTCAGA AAGATAAGT GGCGAGGCC TACAGTGAGA GCCCTGGAC TCTACCCCC TTTCGCTCT TCCCTCTTG GAGTCTTCC GACATGTTA CTGACCTCT TCTATCTA CGGCTCCG ATGTCACTCT Dominio intracelular de cadena zeta de CD3

Figura 19 (5 de 6)



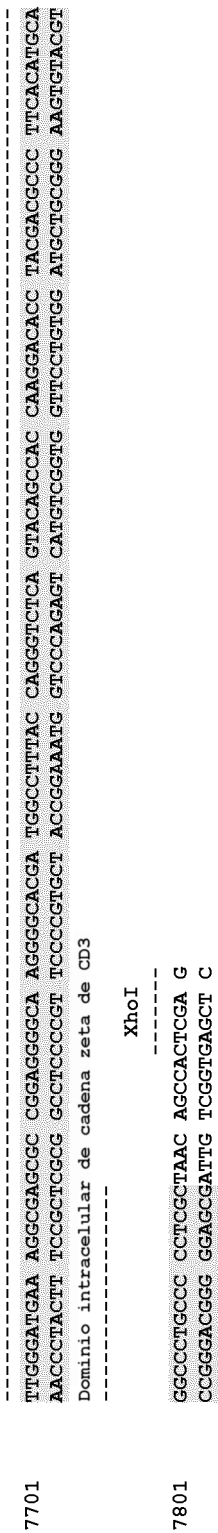


Figura 19 (6 de 6)

Figura 20A

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

**TLDRKSVFVDGYSQNRDD**

**19 AA**

2. Péptido 2 de 1<sup>er</sup> bucle de cisteína de ratón (SEQ ID NO:22)

**KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSLQNFSP**

**33 AA**

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

**SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQ**

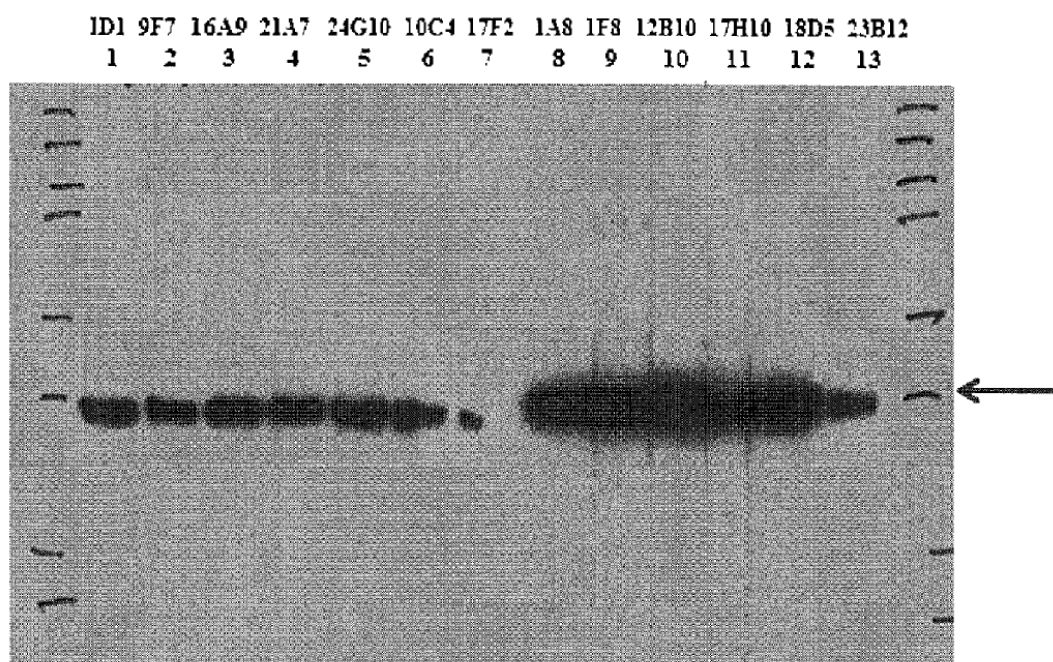
**32 AA**

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

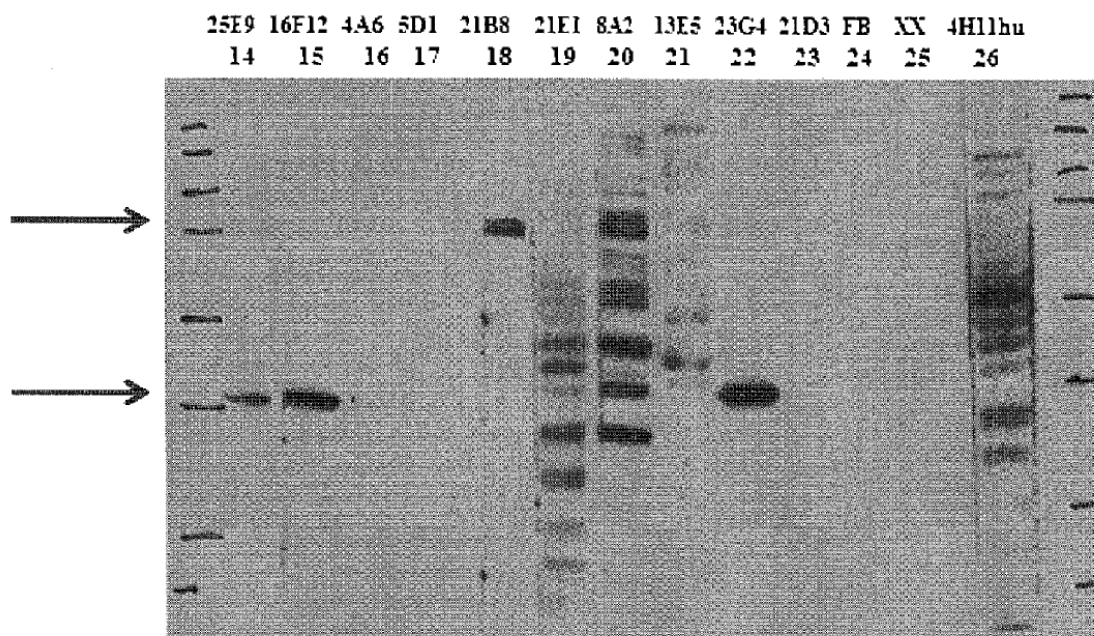
completo de ratón 8244	HLIRPLVQNE--- <b>Peptido 3 (2º bucle de cisteína)</b>
completo humano 14167	HLIRPLFQKSSMGFFYLGGQLISLRPEKDGAATGVDTT <b>Peptido 3 (2º bucle de cisteína)</b> TYHPDPVGPGLDIQQLYWELS
	***:***:*.:. .:* .:* * ***:*:*:***:*. *:* * * ** *:** :*:
completo de ratón 8304	QLTQGVTLGSYMLDQNSIVNGYVPLNITIQGKYQLNE <b>Peptido 2 (1º bucle de cisteína)</b> IINWNLNNTDPTSSEYITLE
completo humano 14227	QLTHGVTQLGFYVLDRLSLFINGYAPQNLSIRGEYQINFHIVNWNLSNPDPPTSSEYITLL
	***:***** *:***:***:***.* *:***:***:*** *:***:*.*****
completo de ratón 8364	RDIEDKVTTLTYGSQLKEVFQ <b>Peptido 1 (CD)</b> SLVTNMTSGSTVVTLEALFSSHLDPNLVKQVFLNKTLN
completo humano 14287	RDIQDKVTTLTKGSQLHDTFRE <b>Peptido 1 (CD)</b> SLVTNLTMDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLN
	***:*****.***:*.*: *****.* .*:***:***:***.***:***:***
completo de ratón 8424	ASSHWLGATYQLKDLHVIDMKTSILLPAEIPTTSSSSQHFNLFNTITNLPYSQDIAQPST
completo humano 14343	ASFHWLGSTYQLVDIHVTEMESVYQ---PTSSSSQHFFYLNFTITNLPYSQDKAQPGT
	** *****:*** *:*** :*:*: *****:*** ***** ***** *
completo de ratón 8484	TKYQQTKRSIENALNQLFRNSSI <b>Peptido 2 (1º bucle de cisteína)</b> SEYFSECCQLAFRSVSMNMANIGVDGLNTSPHARRV
completo humano 14402	TNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSD <b>Peptido 2 (1º bucle de cisteína)</b> QVSTFRSVPN-RHHTGVDSLQNFSPHARRV
	*:*.:.**.*:***** ***** *:***.* .:*****
completo de ratón 8544	DRVAIYEEFLRMTHNGTQLLNE <b>Peptido 1 (CD)</b> ILIRKAVLVQYVQVNEFDVMKNSGLPFWAILILI <b>Peptido 1 (CD)</b> LAV
completo humano 14462	DRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFITLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFWAVILIGLAG
	*****:***** *****.*:***** **: : *.*****:*** **
completo de ratón	LLVLIT <b>Peptido 1 (CD)</b> LMCCFLVTV <b>Peptido 1 (CD)</b> RRKKEGDYQVQRHRLAYYLSHLDLRKLQ 8589
completo humano	LLGVIT <b>Peptido 1 (CD)</b> LICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQ <b>Peptido 1 (CD)</b> PGYYQSHLDLEDLQ 14507
	** :***:*.***. *****:***:*. ** *****.***

**Figura 21**

**Péptido 1 de MUC16 CD de ratón**



**Péptido 3 de MUC16 CL de ratón**

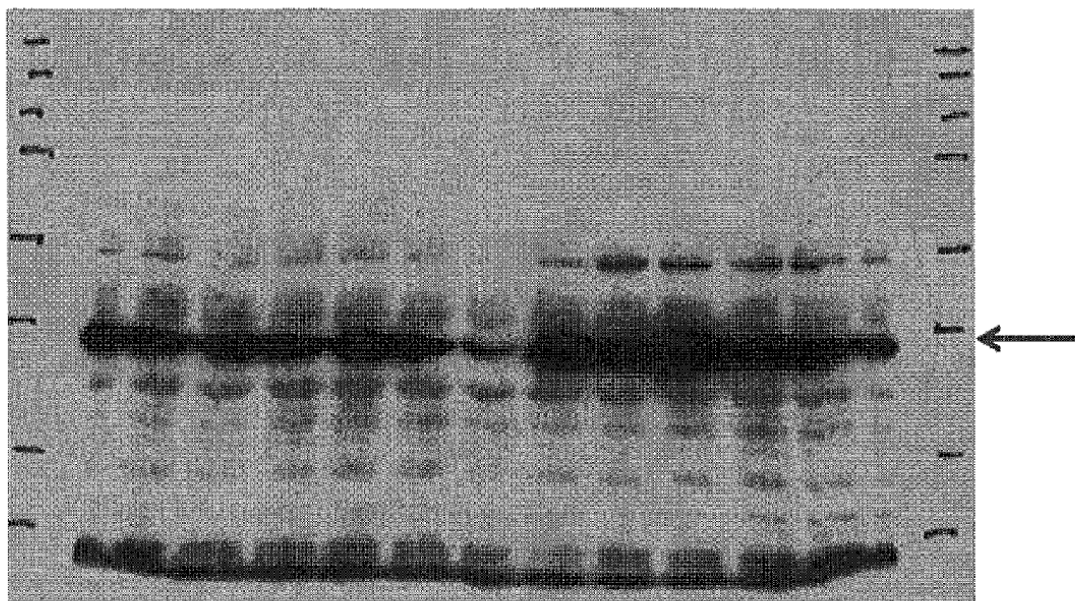




**Figura 22**

**Péptido 1 de MUC16 CD de ratón**

ID1	9F7	16A9	21A7	24G10	10C4	17F2	1A8	1F8	12B10	17H10	18D5	23B12
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13



**Péptido 3 de MUC16 CL de ratón**

25E9	16F12	4A6	5D1	21B3	21E1	8A2	13E5	23G4	21D3	FB
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

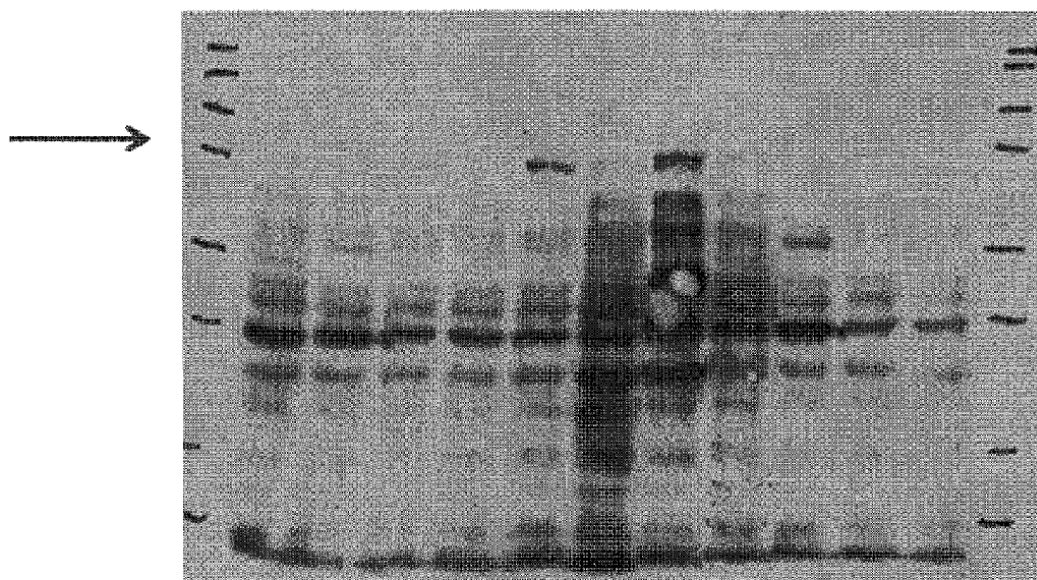
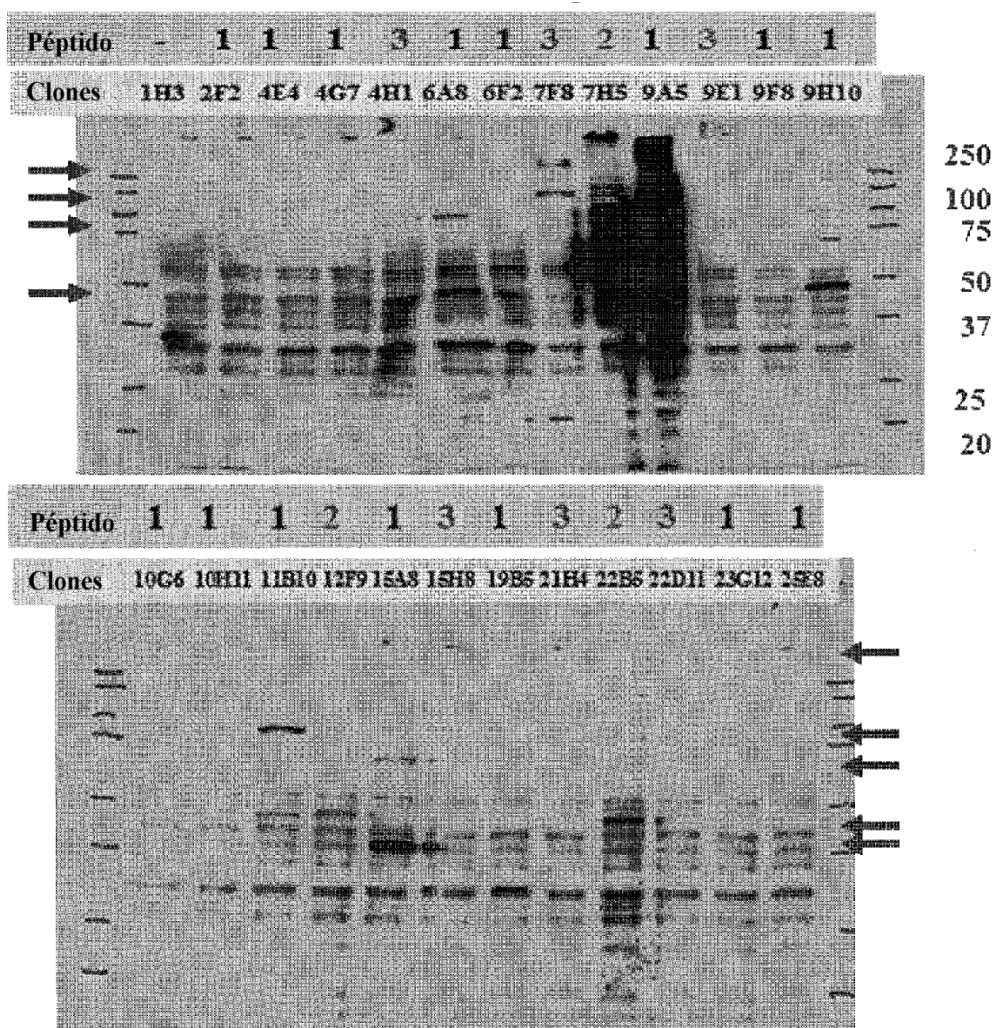
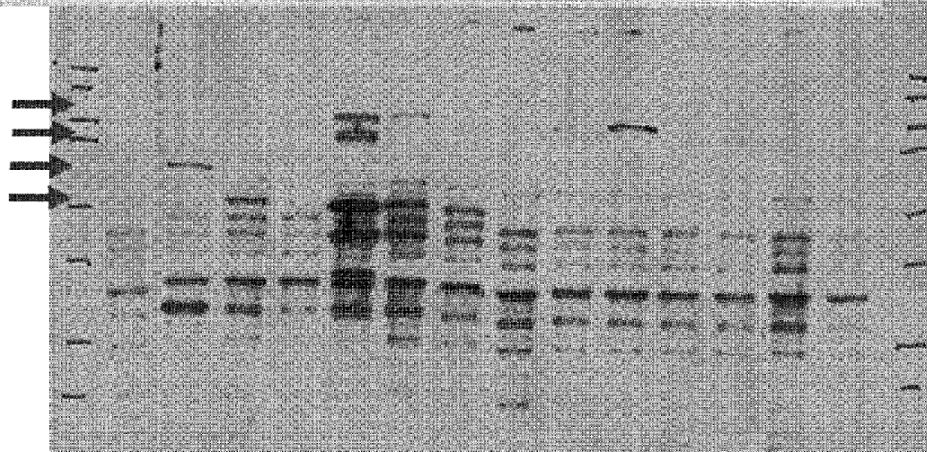




Figura 23

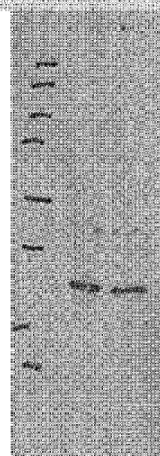


Péptido	3	1,2,3	2	1	2	2	1,2	1	1	1	-	1	1	-
Clones	27H9	28B12	28C12	30F2	31A11	31C1	33H6	34F10	34H5	36C1	36C11	36E4	37E10	FB



Péptido - 1

Clones FB 10H11



**A. Secuencia de nucleótidos que codifica 12B10.3G10-V<sub>H</sub> (SEQ ID NO:26)**

GAGGTGAAGCTCGAGGAGTCAGCTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAACTCTCATGTGCCGCCCTCT  
GGTTTCACCTTCAATACCTATGCCGTGCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTATGGAATGGGTTCGTCC  
ATARGAAGTAAAGTGGAAATTTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTCAAGACAGATTCACCATCTCCACAAAT  
GATTCACAGAGCATGCTCTATCTGCAATGAATAACCTGAAAATGAGGACACAGCCATATATTACTGTGTGAGA  
GCGGGTAACAACGGGGGCTTTCTTACTGGGGTCAAGGGACCAAGGTCACCGTCTCTCTCA

**B. Secuencia de aminoácidos de 12B10.3G10-V<sub>H</sub> (SEQ ID NO:27)**

EVKLEESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAVHWVRQAPGKGMWVVARIRSKSGNYAT  
YYADSVKDRFTISRNDQSMLYLQMNNLKTEDTAIYYCVRAGNNGAFPYWGQGTTVTVSS

**C. Secuencia de nucleótidos que codifica 12B10.3G10-V<sub>L</sub> (SEQ ID NO:28)**

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

GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCACTCTCTGCATCTCTGGGAGSCAGAGTCACCATCACTTGCAAGGCT  
AGCCAGATATTAAGAAGTATATAGCTTGGTACCAACACAAAGCCTGGAAAGACTCCTCGACTACTCATACATTT  
ACATCTACATTACAGACAGGCATCCATCAAGGTTCAAGTGGAGCTGGGTCTGGGAGAGACTATTCTTCAGCATC  
AGCAACCTGGAGTCTGAAGATATTGCAACTTAATTATTGTCTACAGTATGATAGTCTGTACACGTTCCGGAGGGGG  
ACCAAGCTGGAGATCAACCGGCGGCGCA

**D. Secuencia de aminoácidos de 12B10.3G10-V<sub>L</sub> (SEQ ID NO:29)**

DIETQSPSSLSASLGGRVITICKASQDIKKYLAWYQHKPGKTPRLIHIFISTLQTGIPS  
RFSGRGSGRDYSFISISNLESEDIATYYCLQYDSLTYTFGGGTKLEIKRAAA

Figura 24



Figura 25

