

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 952**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2002 E 14179937 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2913673**

54 Título: **Diagnóstico de carcinoma de ovario**

30 Prioridad:

29.08.2001 US 316537 P

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

04.08.2017

73 Titular/es:

**PACIFIC NORTHWEST RESEARCH INSTITUTE
(100.0%)
720 Broadway
Seattle, WA 98122, US**

72 Inventor/es:

**SCHUMMER, MICHEL;
HELLSTROM, INGEGERD;
HELLSTROM, KARL, ERIK;
LEDBETTER, JEFFREY, A y
HAYDEN-LEDBETTER, MARTHA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 628 952 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

Diagnóstico de carcinoma de ovario

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al diagnóstico de carcinoma de ovario.

Antecedentes de la invención

10

El cáncer incluye una amplia gama de enfermedades, que afectan aproximadamente a uno de cada cuatro individuos en todo el mundo. La gravedad del impacto adverso del cáncer es profunda, que influye en las políticas médicas y los procedimientos, así como a la sociedad en general. Debido a que una característica distintiva de muchos tipos de cáncer es la proliferación rápida y no regulada de células malignas, un problema general en la mejora de los enfoques relacionados con el cáncer es la necesidad de detección y diagnóstico precoz. Se han hecho numerosos intentos para desarrollar criterios precisos y confiables para diagnosticar la presencia de una condición maligna. En particular, los esfuerzos se han dirigido al uso de marcadores antigénicos definidos serológicamente conocidos como antígenos asociados a tumores, que son o bien expresados exclusivamente por células cancerosas o están presentes en niveles notablemente más altos en sujetos que tienen una condición maligna.

15

20

Sin embargo, debido a la alta heterogeneidad de la expresión del antígeno asociado con el tumor, por ejemplo, la extrema diversidad de antígenos de carcinoma, existe la necesidad de marcadores tumorales adicionales que sean útiles en el diagnóstico de cáncer. Se conocen muchos anticuerpos monoclonales reactivos con antígenos asociados a carcinoma (véase, por ejemplo, Papsidero, 1985, *Semin. Surg. Oncol.*, 1: 171, Allum et al., 1986, *Surg. Ann*, 18:41). Estos y otros anticuerpos monoclonales descritos se unen a una variedad de diferentes antígenos asociados a carcinomas incluyendo glicoproteínas, glicolípidos y mucinas (véase, por ejemplo, Fink et al., 1984 *Prog. Clin. Pathol.* 9: 121; patentes de Estados Unidos Nos. 4.737.579; 4.753.894, 4.579.827, 4.713.352). Muchos de estos anticuerpos monoclonales reconocen antígenos asociados a tumores que exhiben una expresión restringida en algunos, pero no en otros tumores originados en un linaje celular o tipo de tejido dado.

25

30

Existen sólo relativamente pocos ejemplos de antígenos asociados a tumores que parecen ser útiles para identificar un tipo particular de neoplasia maligna. El anticuerpo monoclonal B72.3, por ejemplo, se une específicamente a un antígeno de mucina asociado a tumor de alto peso molecular ($> 10^6$ Da) que se expresa selectivamente en un cierto número de diferentes carcinomas, incluyendo la mayoría si no todos los carcinomas de ovario y una abrumadora mayoría de carcinomas de pulmón de células no pequeñas, carcinomas de colon y carcinomas de mama (véase, por ejemplo, Johnston, 1987 *Acta Cytol.*, 1: 537; patente de los Estados Unidos No. 4.612.282). Sin embargo, la detección de marcadores tumorales asociados a células tales como el antígeno de mucina reconocido por B72.3 tras la resección quirúrgica de un tumor puede ser de utilidad limitada para el cribado diagnóstico, en donde se prefiere la detección temprana de una condición maligna antes de la acumulación de masa tumoral sustancial.

35

40

Una alternativa al diagnóstico de un tipo particular de cáncer mediante el cribado de especímenes resecados quirúrgicamente para antígenos asociados a tumores, en los que la cirugía invasiva se indica habitualmente sólo después de la detección de una masa tumoral acumulada, sería proporcionar composiciones y métodos para detectar tales antígenos en muestras obtenidas de sujetos mediante procedimientos no invasivos o mínimamente invasivos. En los carcinomas de ovario y de otro tipo, por ejemplo, existen actualmente una serie de antígenos asociados a tumores solubles que son detectables en muestras de fluidos biológicos fácilmente obtenidos tales como secreciones de suero o mucosas. Uno de tales marcadores es CA125, un antígeno asociado a carcinoma que también se vierte en el torrente sanguíneo, donde es detectable en suero (por ejemplo, Bast et al., 1983 *N. Eng. J. Med.* 309: 883; Lloyd et al., 1997 *Int. J. Canc.* 71: 842). Los niveles de CA125 en suero y otros fluidos biológicos se han medido junto con niveles de otros marcadores, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC), antígeno específico de polipéptido tisular (TPS), sialil TN mucina (STN) y fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), en esfuerzos para proporcionar perfiles diagnósticos y/o pronósticos de carcinomas de ovario y otros (por ejemplo, Sarandakou et al., 1997 *Acta Oncol.* 36: 755 Sarandakou et al., 1998 *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 19:73, Meier et al., 1997 *Anticanc Res.* 17 (4B): 2945, Kudoh et al., 1999 *Gynecol Obstet, Invest.* 47:52, Ind et al., 1997 *Br. J. Obstet, Gynaecol.* 104: 1024, Bell et al., 1998, *Br. J. Obstet, Gynaecol.* 105: 1136, Cioffi et al., 1997 *Tumori* 83: 594, Meier et al., 1997, *Anticanc Res.* 17 (4B): 2949, Meier et al., 1997 *Anticanc Res.* 17 (4B): 3019).

50

55

Sin embargo, niveles elevados de CA125 solo en suero o en combinación con otros indicadores conocidos, no proporcionan un diagnóstico definitivo de malignidad o de una malignidad particular tal como carcinoma de ovario. Por ejemplo, CA125, CEA y SCC elevados en el fluido vaginal y en suero se correlacionan más fuertemente con inflamación en las enfermedades ginecológicas benignas, en relación con el cáncer de cuello uterino y los cánceres del tracto genital (por ejemplo, Moore et al., 1998, *Infect. Diste Obstet Gynecol.* 6: 182, Sarandakou et al., 1997 *Acta Oncol.*, 36: 755). Como otro ejemplo, CA125 elevado en suero también puede acompañar al neuroblastoma (por ejemplo, Hirokawa et al., 1998 *Surg. Today* 28: 349), mientras que CEA y SCC elevados, entre otros, pueden acompañar al cáncer colorrectal (Gebauer et al., 1997, *Anticanc. Res.* 17 (4B): 2939). Otro marcador, el antígeno de diferenciación mesotelina, se expresa en las superficies de las células mesoteliales normales y también en ciertas células cancerosas,

60

65

incluyendo los tumores epiteliales de ovario y mesoteliomas. Las composiciones y métodos pertenecientes a la mesotelina (Chang et al., 1992, *Canc. Res.* 52: 181, Chang et al., 1992 *Int. J. Canc.* 50: 373, Chang et al., 1992 *Int. J. Canc.* 51: 548, Chang et al., 1996 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93: 136, Chowdhury et al., 1998 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 669, Yamaguchi et al., 1994 *J. Biol. Chem.* 269: 805, Kojima et al., 1995 *J. Biol. Chem.* 270: 21984) y el antígeno relacionado con la mesotelina estructuralmente relacionada (MRA, véase, por ejemplo, Scholler et al., 1999 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96: 11531) son conocidos en la técnica, incluyendo usos en la detección de cáncer y terapias como se describe en el documento WO 00/50900 y en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 09/513.597. Por lo tanto, es evidente la necesidad apremiante de utilizar marcadores adicionales, incluyendo marcadores útiles en el cribado de diagnóstico multifactorial. (Véase, por ejemplo, Sarandakou et al., 1998, Kudoh et al., 1999, Ind et al., 1997).

Tal como se describe con mayor detalle a continuación, tales marcadores adicionales podrían proporcionarse de manera útil desde dentro de la familia de proteínas "nucleares de cuatro enlaces disulfuro", que comprende un grupo heterogéneo de pequeñas moléculas de función divergente, estables al ácido y al calor, que incluye la proteína nuclear epididimal humana de cuatro enlaces disulfuro, o "HE4" (Kirchhoff et al., 1991, *Biol. Reprod.* 45: 350 - 357, Wang et al., 1999 *Gene* 229: 101, Schummer et al., 1999 *Gene* 238: 375). Se cree que el espaciado conservado de ocho residuos nucleares de cisteína en las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos miembros de la familia nuclear de cuatro disulfuros dirige el plegado de estas moléculas en una estructura compacta y estable. Muchos de los miembros de la familia nuclear de cuatro enlaces disulfuro son inhibidores de proteasa; sin embargo, para algunos miembros de la familia, incluyendo HE4, no se ha identificado aun definitivamente ninguna función. Otros miembros de la familia de proteínas nucleares de cuatro enlaces disulfuro incluyen proteína Wp, SLP-1 y ps20, y se han aislado miembros adicionales de la familia de proteínas nucleares de cuatro enlaces disulfuro de varias especies. Estas proteínas comparten varias propiedades, incluyendo su pequeño tamaño y su estructura estable al calor y al ácido, que es estabilizada por el núcleo de cuatro enlaces disulfuro. Estas proteínas están hechas por células secretoras, y se encuentran en secreciones mucosas tales como plasma seminal, secreción de leche, de la parótida y cervicales.

La molécula prototipo de la familia nuclear de cuatro disulfuros, la proteína Wp, también se conoce como la fosfoproteína de suero de leche, y ha sido clonada (Dandekar et al., 1982 *Proc. Nat. Ac.*, USA 79: 3987- 3991). La fosfoproteína de suero se expresa en leche a aproximadamente 1-2 mg/ml, pero no se expresa por carcinomas de mama, donde el gen está hipermetilado. No se ha encontrado actividad inhibitora hacia las proteasas para la fosfoproteína del suero. Sin embargo, la sobreexpresión del gen en animales transgénicos perjudica el desarrollo de células alveolares mamarias (Burdon et al., 1991, *Mecanismos Dev.* 36: 67-74), lo que sugiere un papel importante para esta proteína durante la lactancia. El inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora (SLP-1), otra proteína de la familia nuclear de cuatro disulfuros, se clonó a partir del cuello uterino humano, pero también está presente en otras secreciones de moco, incluyendo el plasma seminal y las secreciones parotídeas (Heinzel et al., 1986, *Eur. Biochem.*, 160: 61-67). La SLP-1 es una proteína de dos dominios de 12 kDa que es un potente inhibidor de tripsina, quimotripsina, elastasa y catepsina G. Se ha publicado la estructura cristalina de SLP-1 complejada con quimotripsina (Grutter et al., 1988 *EMBO J.* 7: 345-351). Estos datos mostraron que los dominios SLP-1 pueden trabajar independientemente y simultáneamente para inhibir diferentes proteasas, e identificaron un sitio activo pequeño (8 aminoácidos) en el dominio dos que se une a la quimotripsina.

Elafina es un miembro de la proteína de dominio único de la familia nuclear de cuatro disulfuros que se aisló de la piel psoriásica humana para determinar la secuencia de aminoácidos de este polipéptido (Wiedow et al., 1990 *J. Biol. Chem.* 265: 14791-14795). Elafina es un potente inhibidor de la elastasa, pero no exhibe una actividad inhibitora evidente hacia otras proteasas tales como tripsina, quimotripsina, catepsina G o plasmina. La secuencia de aminoácidos de elafina muestra 38% de homología con la región del extremo terminal C (dominio 1) de SLP-1. El gen que codifica la proteína ps20 se aisló recientemente a partir del músculo liso y la proteína ps20 se expresó por transfección del gen en células de mamífero (Larsen et al., 1998 *J. Biol. Chem.* 273: 4574-4584). Se encontró que ps20 inhibe el crecimiento de células de carcinoma, y ps20 ha sido denominado inhibidor del crecimiento; sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ninguna actividad funcional directa tal como la inhibición de proteasas para esta proteína.

Como se ha indicado anteriormente, no se ha identificado actividad inhibitora de proteasa para HE4, la cual se identificó inicialmente en células epiteliales epididimales, aunque se han caracterizado otros inhibidores de proteasas pequeños estables al ácido y térmicamente a partir de plasma seminal, y se cree que juegan un papel en la fertilidad por unión a espermatozoides y regulación de la interacción de espermatozoides con las matrices extracelulares del óvulo (Fitz et al., en *Proteases and Biological Controls*, Reich, E., Rifkin, D., Shaw, E. (eds.), 1975 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, páginas 737-766, Saling, 1989 *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 11: 339-388). El ADNc de HE4 se aisló primero a partir del epidídimo humano (Kirchhoff et al., 1991 *Biol. Reprod.* 45: 350-357), y el ADNc de HE4 se detectó posteriormente con alta frecuencia en bibliotecas de ADNc construidas a partir de carcinomas de ovario (Wang et al., 1999 *Gene* 229: 101, Schummer et al., 1999, *Gene* 238: 375).

El artículo anteriormente mencionado de Schummer et al. se refiere a hibridación de ADNc de alta densidad para identificar transcritos de ARNm que están elevados en tejidos de cáncer de ovario. Se demostró que el ARNm de He4 estaba sobreexpresado en el cáncer de ovario, pero los autores no hacen ninguna sugerencia a la sonda de anticuerpos para la proteína soluble correspondiente en una muestra de sangre.

Un estudio de Schmandt et al. (reportado como "Differential expression of the secreted protease inhibitor, HE4, in epithelial ovarian cancer" en Gynecol. Oncol. Vol. 80, No. 2, febrero 2001, página 319) comparó el nivel de expresión de ARNm de HE4 en muestras de tumor de ovario de diferentes tipos y se encontró que este se incrementa en tumores primarios serosos y endometrioides primarios de ovario.

HE4 (SEQ ID NO: 11) está entre una larga lista de objetivos potenciales identificados en el documento WO 01/59064. Este documento sugiere un gran número de enfermedades y ensayos en los que pueden utilizarse objetivos potenciales, sin sugerir específicamente que HE4 sea útil para la detección de carcinoma de ovario mediante una prueba de inmunodiagnóstico.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para detectar de presencia de carcinoma de ovario en un sujeto que comprende:

poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con al menos un anticuerpo específico para el polipéptido del antígeno que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 para determinar la presencia en dicha muestra biológica de una molécula de origen natural en forma soluble en dicha muestra y que tiene un determinante antigénico que es reactivo con dicho al menos un anticuerpo, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión de dicho anticuerpo a dicho determinante antigénico, y a partir de allí detectar la presencia de un carcinoma de ovario, caracterizado porque la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma.

El polipéptido del antígeno de la SEQ ID NO: 11 se denomina aquí HE4a. Esto refleja que la secuencia de ADNc de HE4 tal como se publicó originalmente por Kirchoff et al. ha sido corregido como se describe en el Ejemplo 2.

La detección de acuerdo con la invención como se ha indicado anteriormente se puede complementar determinando adicionalmente CA-125 en una muestra de sangre, suero o plasma del sujeto.

En ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-HE4a comprende un anticuerpo policlonal y, en otras realizaciones, el anticuerpo comprende un anticuerpo purificado por afinidad. En realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo comprende un anticuerpo recombinante y en otra realización el anticuerpo comprende un anticuerpo quimérico. En otra realización, el anticuerpo comprende un anticuerpo humanizado. En otra realización, el anticuerpo comprende un anticuerpo monocatenario.

En algunas realizaciones de la invención, la detección de la unión del anticuerpo a un determinante antigénico comprende la detección de un radionúclido. En otras realizaciones, la detección de la unión del anticuerpo a un determinante antigénico comprende la detección de un fluoróforo. En otra realización, la detección de la unión del anticuerpo a un determinante antigénico comprende la detección de un evento de unión entre una molécula de avidina y una molécula de biotina y en otra realización la detección de la unión del anticuerpo a un determinante antigénico comprende la detección de un evento de unión entre una molécula de estreptavidina y una molécula de biotina. En ciertas realizaciones, la detección de la unión del anticuerpo a un determinante antigénico comprende la detección espectrofotométrica de un producto de una reacción enzimática. En algunas realizaciones de la invención, al menos un anticuerpo se marca de forma detectable, mientras que en ciertas otras realizaciones al menos un anticuerpo no se marca de forma detectable y la detección de la unión del anticuerpo a un determinante antigénico es indirecta.

También se divulga ahora un método de detección de la presencia de una condición maligna en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con al menos un anticuerpo para determinar la presencia en la muestra biológica de una molécula seleccionada del grupo que consiste en (i) una molécula de origen natural en forma soluble en la muestra, y (ii) una molécula de la superficie de la célula en la que la muestra comprende una célula del sujeto, teniendo la molécula un determinante antigénico que es reactivo con al menos un anticuerpo, cuyo sitio de combinación del antígeno inhibe competitivamente la unión inmunespecífica de un anticuerpo monoclonal que es 2H5, 3D8 o 4H4, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión del anticuerpo al determinante antigénico y, a partir de ello, detectar la presencia de una condición maligna.

También se divulga un método para detectar la presencia de una condición maligna en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con al menos un anticuerpo para determinar la presencia en la muestra biológica de una molécula seleccionada del grupo que consiste en (i) una molécula de origen natural en forma soluble en la muestra, y (ii) una molécula de la superficie de la célula en la que la muestra comprende una célula del sujeto, teniendo la molécula un determinante antigénico que es reactivo con el anticuerpo, cuyo sitio de combinación del antígeno inhibe competitivamente la unión inmunespecífica de un anticuerpo monoclonal 3D8, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión del anticuerpo al determinante antigénico y, a partir de ello, detectar la presencia de una condición maligna.

Todavía otro aspecto de la divulgación proporciona un método para detectar la presencia de una condición maligna en

5 un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con al menos un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a para determinar la presencia en la muestra biológica de una molécula seleccionada del grupo que consiste en (i) una molécula de origen natural en forma soluble en la muestra, y (ii) una molécula de la superficie de la célula en donde la muestra comprende una célula del sujeto, teniendo la molécula un determinante antigénico que es reactivo con el anticuerpo, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión de al menos un anticuerpo al determinante antigénico, en donde al menos un anticuerpo se une inmuno-específicamente al antígeno HE4a y, a partir de éste, detecta la presencia de una condición maligna. En tales métodos, el antígeno HE4a también es inmuno-específicamente reactivo con el anticuerpo monoclonal 3D8, 2H5 o 4H4.

10 Volviendo a otro aspecto, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de una condición maligna en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con al menos un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a para determinar la presencia en la muestra biológica de una molécula seleccionada del grupo que consiste en (i) una molécula que se presenta naturalmente en forma soluble en la muestra, y (ii) una molécula de la superficie de la célula en la que la muestra comprende una célula del sujeto, teniendo la molécula un determinante antigénico que es reactivo con al menos un anticuerpo, cuyo sitio de combinación del antígeno inhibe competitivamente la unión inmuno-específica de un anticuerpo monoclonal que es 2H5 o 4H4, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión del anticuerpo al determinante antigénico, en donde al menos un anticuerpo se une inmuno-específicamente al antígeno HE4a y, a partir de él, detecta la presencia de una condición maligna. En tal método, el antígeno relacionado con la mesotelina también reacciona inmuno-específicamente con el anticuerpo monoclonal 3D8.

25 En relación con otro aspecto, la divulgación proporciona un método de detectar de la presencia de una condición maligna en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con al menos un primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a para determinar la presencia en la muestra biológica de una molécula de origen natural en forma soluble en la muestra, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para unir específicamente al menos un primer anticuerpo inmovilizado al polipéptido antigénico HE4a y formar así un complejo inmune; eliminar los constituyentes de la muestra que no se unen específicamente a al menos un primer anticuerpo inmovilizado; y poner en contacto el complejo inmune con al menos un segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a, en donde el sitio de combinación del antígeno de al menos un segundo anticuerpo no inhibe competitivamente el sitio de combinación del antígeno de al menos un primer anticuerpo inmovilizado, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión específica de al menos un segundo anticuerpo al polipéptido antigénico HE4a, a partir de ello, detectar la presencia de una condición maligna.

35 En aun otro aspecto, la divulgación proporciona un método de detección para la presencia de una condición maligna en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con al menos un primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a para determinar la presencia en la muestra biológica de una molécula de origen natural en forma soluble en la muestra, en donde el sitio de combinación del antígeno de al menos un primer anticuerpo inhibe competitivamente la unión inmuno-específica del anticuerpo monoclonal 3D8 bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para unir específicamente al menos un primer anticuerpo inmovilizado al polipéptido antigénico HE4a y formar así un complejo inmune; eliminar los constituyentes de la muestra que no se unen específicamente a al menos un primer anticuerpo inmovilizado; y poner en contacto el complejo inmune con al menos un segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a, en donde el sitio de combinación del antígeno de al menos un segundo anticuerpo no inhibe competitivamente la unión inmuno-específica del anticuerpo monoclonal 2H5, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión específica de al menos un segundo anticuerpo al polipéptido antigénico HE4a, y a partir de ello, detectar la presencia de una condición maligna.

50 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar la presencia de una condición maligna en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con al menos un primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a para determinar la presencia en la muestra biológica de una molécula de origen natural en forma soluble en la muestra, en donde el sitio de combinación del antígeno de al menos un primer anticuerpo inhibe competitivamente la unión inmuno-específica del anticuerpo monoclonal 3D8 bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para unir específicamente al menos un primer anticuerpo inmovilizado al polipéptido antigénico HE4a y formar así un complejo inmune; eliminar los constituyentes de la muestra que no se unen específicamente a al menos un primer anticuerpo inmovilizado; y poner en contacto el complejo inmune con al menos un segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a, en donde el sitio de combinación del antígeno de al menos un segundo anticuerpo no inhibe competitivamente la unión inmuno-específica del anticuerpo monoclonal 4H4, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión específica de al menos un segundo anticuerpo al polipéptido del antígeno relacionado con la mesotelina y, a partir de ello, detectar la presencia de una condición maligna.

60 En ciertas realizaciones el método de la presente invención comprende además determinar la presencia en la muestra de al menos un marcador soluble de una condición maligna, en donde al menos un marcador es CA125.

65 Otro aspecto de la divulgación es proporcionar un método de detección de la presencia de una condición maligna en un sujeto, que comprende poner en contacto cada uno de (i) una primera muestra biológica de un primer sujeto sospechoso de tener una condición maligna y (ii) una segunda muestra biológica de un segundo sujeto que se sabe

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

está libre de una condición maligna, con al menos un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a para determinar la presencia en cada una de las primera y segunda muestras biológicas de una molécula seleccionada del grupo que consistente en (i) una molécula de origen natural en forma soluble en la muestra, y (ii) una molécula de la superficie de la célula en la que la primera y la segunda muestras biológicas comprenden cada una, respectivamente, una célula de del primero y segundo sujetos, teniendo la molécula un determinante antigénico que es reactivo con al menos un anticuerpo, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión del anticuerpo al determinante antigénico, y comparar un nivel de unión detectable del anticuerpo al determinante antigénico en la primera muestra biológica con un nivel de unión detectable del anticuerpo con el determinante antigénico en la segunda muestra biológica y, a partir de ello, detectar la presencia de una condición maligna.

Volviendo a otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a, que comprende una región variable de inmunoglobulina monoclonal que se une específicamente a un polipéptido antigénico HE4a que consiste de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es una proteína de fusión, mientras que en ciertas otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única. En ciertas otras realizaciones, el polipéptido antigénico HE4a comprende además un polipéptido glicosilado. En otra realización, el anticuerpo se une específicamente a una secuencia de polipéptido antigénico HE4a expuesta en la SEQ ID NO: 11 pero no se une específicamente a una secuencia de polipéptido expuesta en la SEQ ID NO: 9, o el anticuerpo se une específicamente tanto a la secuencia del polipéptido antigénico HE4a expuesta en la SEQ ID NO: 11 como a la secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 9. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 2H5, 3D8 o 4H4.

Todavía en otro aspecto, la divulgación proporciona un método de detección de la presencia de una condición maligna en un sujeto que comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un polipéptido HE4a marcado en forma detectable, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión al polipéptido HE4a de un anticuerpo de origen natural en forma soluble en la muestra, y a partir de ello, detectar la presencia de una condición maligna.

Volviendo a otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que es una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico HE4a, comprendiendo el polipéptido una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOS: 5, 7, 11 o 13; o que es una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido o proteína de fusión del antígeno HE4a o que es capaz de hibridarse con dicha molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno HE4a en condiciones moderadamente rigurosas, en donde la molécula de ácido nucleico aislada no es una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 9. También se divulga un oligonucleótido antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos complementarios a la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico HE4a.

También se divulga una proteína de fusión que comprende una secuencia polipeptídica fusionada a un polipéptido antigénico HE4a. En ciertas proteínas de fusión, el dominio de fusión es una inmunoglobulina o una variante o fragmento de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, la secuencia polipeptídica fusionada a un polipéptido antigénico HE4a es escindible por una proteasa. En otra realización, la secuencia polipeptídica es un polipéptido marcador de afinidad que tiene afinidad por un ligando.

También se divulga un constructo de expresión recombinante que comprende al menos un promotor enlazado operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico HE4a como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor regulado y en ciertas otras realizaciones, el polipéptido antigénico HE4a se expresa como una proteína de fusión con un producto polipeptídico de una segunda secuencia de ácido nucleico. En una realización adicional, el producto polipeptídico de la segunda secuencia de ácido nucleico es una región constante de inmunoglobulina. En otra realización, el constructo de expresión es un constructo de expresión viral recombinante. Adicionalmente se divulga una célula huésped que comprende un constructo de expresión recombinante como se proporciona en la presente memoria. En una realización, la célula huésped es una célula procariota y en otra realización la célula huésped es una célula eucariota.

También se describe un método para producir un polipéptido antigénico HE4a recombinante mediante el cultivo de una célula huésped que comprende un constructo de expresión recombinante que comprende al menos un promotor operablemente enlazado a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico HE4a como se proporciona en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor regulado. En otra realización, la invención proporciona un método para producir un polipéptido antigénico HE4a recombinante, mediante el cultivo una célula huésped infectada con el constructo de expresión viral recombinante como se proporciona en la presente memoria para la expresión del polipéptido antigénico HE4a recombinante.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la detección por PCR en tiempo real de ADNc que codifica HE4a en un panel de muestras humanas.

La Figura 2 muestra el análisis de transferencia Western de las proteínas de fusión HE4a expresadas.

La Figura 3 representa la detección de anticuerpos reactivos con la proteína de fusión HE4a-mIg en sueros de dos ratones inmunes (1605 y 1734) por ELISA.

5 La Figura 4 representa resultados representativos de la selección de sobrenadantes de hibridomas y detección de anticuerpos de hibridoma específicos de HE4a usando ELISA.

10 La Figura 5 muestra la detección de la proteína de fusión HE4a-hIgG mediante ELISA tipo sándwich doblemente determinante utilizando el anticuerpo monoclonal 3D8 específico de HE4a inmovilizado como reactivo de captura y el anticuerpo monoclonal 2H5 específico de HE4a biotinilado como reactivo de detección. También se muestra la detección de HE4a soluble en el fluido sobrenadante de la línea celular 4007 (Δ) de carcinoma de ovario.

La Figura 6 muestra la detección mediante ELISA tipo sándwich de antígeno HE4a en fluido ascítico diluido en forma serial de un paciente con carcinoma de ovario.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en parte al descubrimiento de una secuencia de polipéptido antigénico (SEQ ID NO: 11) como se describe en los ejemplos. Se ha demostrado que pueden usarse anticuerpos específicos para ese polipéptido (denominado en la presente memoria HE4a) para detectar antígeno sérico sobreexpresado en pacientes con carcinomas de ovario.

20 Por lo tanto, como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona un método de inmunodiagnóstico para detectar la presencia de un carcinoma de ovario empleando una muestra que es una muestra de sangre, suero o plasma. Más particularmente, la invención proporciona un método tal en el que la muestra se pone en contacto con al menos un anticuerpo específico para el polipéptido antigénico que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 para determinar la presencia en la muestra de una molécula de origen natural en forma soluble y que tiene un determinante antigénico que es reactivo con al menos un anticuerpo.

25 Tal como se describe en la presente memoria, se proporcionan anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente polipéptidos HE4a, de tal manera que los expertos en la técnica puedan inmunizar rutinariamente y sin experimentación indebida un huésped y detectar la producción de anticuerpos específicos del polipéptido HE4a usando las presentes enseñanzas junto con metodologías bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se describe aquí la construcción de vectores de expresión recombinante de HE4a y células huésped, incluyendo proteínas de fusión recombinantes de HE4a, y proporciona anticuerpos específicos de HE4a.

30 A partir de las propiedades fisicoquímicas e inmunoquímicas de los polipéptidos HE4a descritos en la presente memoria, y utilizando las secuencias de ácido nucleico descritas actualmente que codifican HE4a, una persona con conocimientos ordinarios en la técnica también puede preparar un polipéptido HE4a recombinante que pueda usarse para producir y caracterizar anticuerpos específicos de acuerdo con metodologías bien conocidas. Los polipéptidos HE4a pueden expresarse en células de mamífero, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células para producir tales proteínas usando ARN derivados de las regiones codificantes de ADN del polipéptido HE4a descritas en la presente memoria. Los vectores apropiados de clonación y expresión para uso con huéspedes procariotas y eucariotas son descritos por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, NY, (1989). Los polipéptidos HE4a pueden expresarse preferiblemente en células de mamífero.

35 Los ácidos nucleicos de uso en conexión con la presente invención pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN, ADN que incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético. El ADN puede ser de cadena bicatenario o monocatenario y si es monocatenario puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido). Una secuencia codificante que codifica un polipéptido HE4a para uso de acuerdo con la invención puede ser idéntica a las secuencias codificantes proporcionadas en las SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 10 o 12 o puede ser una secuencia codificante diferente, la cual, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido HE4a como, por ejemplo, los ADNc de las SEQ ID NOS: 10 y 12. La presente divulgación proporciona por lo tanto una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico HE4a que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 5, 7, 11 o 13, o una molécula de ácido nucleico capaz de hibridarse con dicho ácido nucleico que codifica un polipéptido HE4a, o una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria a la misma.

40 Las variantes exhiben preferiblemente al menos aproximadamente 70% de identidad, más preferiblemente al menos aproximadamente 80% -85% de identidad y más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido antigénico HE4a nativo o una porción del mismo, tal como, por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico expuestas en las SEQ ID NOS.: 10 y 12. El porcentaje de identidad puede determinarse fácilmente comparando secuencias usando algoritmos informáticos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como Align o el algoritmo BLAST (Altschul, J. Mol. Biol. 219: 555-565, 1991, Henikoff y Henikoff, Proc. Nat. Acad. USA 89: 10915-10919, 1992), que está disponible en el sitio web del NCB1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>). Se pueden usar los parámetros por defecto.

Ciertas variantes son sustancialmente homólogas a un gen nativo. Dichas variantes de polinucleótidos son capaces de hibridarse en condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia de ADN o ARN de origen natural que codifica un antígeno HE4a nativo (o una secuencia complementaria). Las condiciones moderadamente rigurosas adecuadas incluyen, por ejemplo, las siguientes etapas o su equivalente: prelavado en una solución de SSC 5X, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50°C-65°C, SSC 5 X, durante la noche; seguido de lavado dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2X, 0,5X y 0,2X que contiene SDS al 0,1%. Para una rigurosidad adicional, las condiciones pueden incluir, por ejemplo, un lavado en SSC 0,1X y SDS al 0,1% a 60°C durante 15 minutos, o el equivalente. Una persona con conocimientos ordinarios en la técnica apreciará fácilmente los parámetros que pueden variarse como un asunto de rutina para crear condiciones de hibridación apropiadamente rigurosas que sean de alguna manera selectivas para un ácido nucleico particular de interés y comprenderán además que tales condiciones pueden ser una función, entre otras, de las secuencias de ácido nucleico particulares implicadas en la hibridación, tales como, por ejemplo, las descritas en la presente memoria como las SEQ ID NOS: 10 y 12, que codifican polipéptidos HE4a. Véase también, por ejemplo, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, 1995, con respecto a la selección de condiciones de hibridación de ácido nucleico.

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos HE4a, por ejemplo los polipéptidos HE4a humanos que tienen las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o cualquier otro polipéptido HE4a para uso de acuerdo con la invención, pueden incluir, pero no se limitan a: únicamente la secuencia codificante para el polipéptido HE4a; la secuencia codificante para el polipéptido HE4a y la secuencia codificante adicional; la secuencia codificante para el polipéptido HE4a (y opcionalmente la secuencia codificante adicional) y la secuencia no codificante, tal como intrones o secuencias no codificantes 5' y/o 3' de la secuencia codificante para el polipéptido HE4a, que por ejemplo puede incluir además, pero no necesitan limitarse a una o más secuencias de ácido nucleico reguladoras que pueden ser un promotor, reforzador regulado o regulable, otra secuencia reguladora de la transcripción, secuencia de unión al represor, secuencia reguladora de la traducción o cualquier otra secuencia reguladora de ácido nucleico. Por lo tanto, el término "ácido nucleico que codifica un polipéptido HE4a" abarca un ácido nucleico que incluye sólo una secuencia codificante para el polipéptido, así como un ácido nucleico que incluye una secuencia o secuencias adicionales codificantes y/o no codificantes.

La presente invención se refiere además a variantes de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria que codifican para fragmentos, análogos y derivados de un polipéptido HE4a, por ejemplo, los polipéptidos HE4a humanos que tienen la secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ ID NO: 11. Las variantes de los ácidos nucleicos que codifican HE4a pueden ser variantes alélicas de origen natural de los ácidos nucleicos o variantes no naturales. Como es conocido en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia de ácido nucleico que puede tener al menos una de una sustitución, una supresión o una adición de uno o más nucleótidos, cualquiera de los cuales no altera sustancialmente la función del polipéptido HE4a codificado. Por lo tanto, por ejemplo, la presente divulgación incluye ácidos nucleicos que codifican los mismos polipéptidos HE4a que se muestran en las SEQ ID NOS: 5, 7 o 11, así como variantes de dichos ácidos nucleicos, variantes que pueden codificar un fragmento, derivado o análogo de cualquier de estos polipéptidos.

Las variantes y derivados de HE4a pueden obtenerse por mutaciones de secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos HE4a. Las alteraciones de la secuencia nativa de aminoácidos pueden llevarse a cabo mediante cualquiera entre varios métodos convencionales. Pueden introducirse mutaciones en loci particulares sintetizando oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligación a fragmentos de la secuencia nativa. Después de la ligación, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o supresión deseada de aminoácidos.

Alternativamente, se pueden emplear procedimientos de mutagénesis específica del sitio dirigida a oligonucleótidos para proporcionar un gen alterado en el que codones predeterminados pueden ser alterados por sustitución, supresión o inserción. Los ejemplos de métodos para realizar tales alteraciones son divulgados por Walder et al. (*Gene* 42: 133, 1986); Bauer et al. (*Gene* 37:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, enero 1985, 12-19); Smith et al. (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); Kunkel (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82: 488, 1985); Kunkel et al. (*Methods in Enzymol.*, 154: 367, 1987); y las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.518.584 y 4.737.462.

En la detección de carcinoma de ovario de acuerdo con la invención, se detectará al menos un polipéptido HE4a natural en la muestra. Como se proporciona aquí, un "polipéptido antigénico HE4a" o "polipéptido HE4a" incluye cualquier polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, incluyendo cualquier fragmento, derivado o análogo del mismo que se unirá a un anticuerpo específico para esa secuencia.

Tal polipéptido HE4a puede ser un polipéptido no modificado o puede ser un polipéptido que se ha modificado postraduccionalmente, por ejemplo por glicosilación, fosforilación, acilación grasa incluyendo modificación del anclaje de glicosilfosfatidilinositol o similar, escisión de fosfolipasa tal como hidrólisis mediada por fosfolipasa c específica de fosfatidilinositol o similares, escisión con proteasa, desfosforilación o cualquier otro tipo de modificación postraduccional de la proteína, tal como una modificación que implica la formación o escisión de un enlace químico covalente.

Los términos "fragmento", "derivado" y "análogo" cuando se refiere a polipéptidos HE4a, polipéptidos antigénicos HE4a o proteínas de fusión de HE4a, se refiere a cualquier polipéptido HE4a que retiene esencialmente la misma función

biológica y/o actividad como tal polipéptido. De este modo, un análogo puede incluir una isoforma del polipéptido antigénico HE4a tal como un polipéptido HE4a diferencialmente modificado postraduccionalmente o una variante tal como una variante de empalme. Como es bien conocido en la técnica, una "variante de empalme" incluye formas variantes o alternativas de un polipéptido que surgen del procesamiento intracelular diferencial de un transcrito de ARN. Por ejemplo, dos especies de ARNm distintas pueden ser variantes de empalme una de la otra donde difieren solamente por la inclusión de la totalidad o una porción de una secuencia correspondiente a un exón particular en una especie de ARNm y su ausencia de las otras especies. Como apreciarán los familiarizados con la técnica, pueden existir otras relaciones estructurales entre especies de ARNm que se considerarán generalmente como variantes de empalme. Un polipéptido HE4a incluye además una proproteína que puede activarse por escisión de la porción de proproteína para producir un polipéptido HE4a activo.

Las funciones y/o actividades biológicas de los fragmentos, derivados y análogos de los polipéptidos HE4a o de los polipéptidos antigénicos HE4a incluyen, pero no necesitan limitarse a, el uso de tales polipéptidos como marcadores en un método de detección para la presencia de una condición maligna en un sujeto como se describe en el presente documento. Por ejemplo, mediante la detección en una muestra del sujeto de una molécula de origen natural en forma soluble y que tiene un determinante antigénico que es reactivo con al menos un anticuerpo específico para un polipéptido HE4a, un experto en la técnica puede controlar una función y/o actividad biológica de un polipéptido HE4a. Además, debe tenerse en cuenta que en ciertas realizaciones el método de detección de la presente invención está dirigido a comparar cantidades relativas, niveles y/o cantidades de una molécula detectable de origen natural en forma soluble y que tiene un determinante antigénico que es reactivo con al menos un anticuerpo específico para un polipéptido HE4a en cada uno de (i) una primera muestra biológica de un primer sujeto sospechoso de tener una condición maligna, y (ii) una segunda muestra biológica de un segundo sujeto que se sabe que está libre de una condición maligna. De acuerdo con ello, la presencia cuantitativa relativa de un polipéptido HE4a en una muestra biológica puede ser una función y/o actividad biológica de un polipéptido HE4a, aunque tal función y/o actividad no deben estar limitadas.

Un fragmento, derivado o análogo de un polipéptido HE4a puede ser (i) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado); (ii) uno en el que se fusionan aminoácidos adicionales con el polipéptido HE4a, incluyendo aminoácidos que pueden emplearse para la purificación del polipéptido HE4a o una secuencia de proproteína; o (iii) un polipéptido HE4a truncado. Tales fragmentos, derivados y análogos se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente invención.

Un polipéptido HE4a truncado puede ser cualquier molécula de polipéptido HE4a que comprende menos de una versión de longitud completa del polipéptido HE4a.

Las técnicas de afinidad son particularmente útiles en el contexto del aislamiento de polipéptidos HE4a y pueden incluir cualquier método que explote una interacción de unión específica con un polipéptido HE4a para efectuar una separación. Por ejemplo, debido a que los polipéptidos HE4a pueden contener fragmentos de oligosacáridos unidos covalentemente (véase, por ejemplo, la Figura 2 como se describe en los Ejemplos), una técnica de afinidad tal como la unión de un polipéptido HE4a a una lectina inmovilizada adecuada en condiciones que permitan la unión de carbohidratos por la lectina puede ser una técnica de afinidad particularmente útil. Otras técnicas de afinidad útiles incluyen técnicas inmunológicas para aislar un polipéptido HE4a, cuyas técnicas se basan en la interacción de unión específica entre sitios de combinación de anticuerpos para antígeno y determinantes antigénicos presentes en los complejos. Las técnicas inmunológicas incluyen, pero no necesitan estar limitadas a, cromatografía de inmutofinidad, inmunoprecipitación, inmutoadsorción en fase sólida u otros métodos de inmutofinidad. Para estas y otras técnicas de afinidad útiles, véase, por ejemplo, Scopes, R.K., *Protein Purification: Principles and Practice*, 1987, Springer-Verlag, NY; Weir, D.M., *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Blackwell Scientific, Boston; y Hermanson, G.T. Et al., *Immobilized Immunity Affinity Ligand Techniques*, 1992, Academic Press, Inc., California; que se incorporan aquí por referencia en su totalidad, para detalles referentes a técnicas para aislar y caracterizar complejos, incluyendo técnicas de afinidad.

Se describen en la presente memoria proteínas de fusión que comprenden un polipéptido fusionado a HE4a. Tales proteínas de fusión HE4a están codificadas por ácidos nucleicos que tienen la secuencia codificadora de HE4a fusionada en el marco a una secuencia codificadora adicional para proporcionar la expresión de una secuencia de polipéptido HE4a fusionada a una secuencia polipeptídica funcional o no funcional adicional que permite, por ejemplo, a manera de ilustración y no de limitación, la detección, aislamiento y/o purificación de la proteína de fusión HE4a. Tales proteínas de fusión HE4a pueden permitir la detección, aislamiento y/o purificación de la proteína de fusión HE4a por afinidad proteína-proteína, afinidad metálica o purificación de polipéptidos basados en afinidad por carga, o mediante escisión con proteasa específica de una proteína de fusión que contiene una secuencia de fusión que puede ser escindida por una proteasa de tal manera que el polipéptido HE4a puede ser separado de la proteína de fusión.

Por lo tanto, las proteínas de fusión HE4a pueden comprender secuencias de polipéptidos de marcadoras de afinidad, que se refieren a polipéptidos o péptidos añadidos a HE4a para facilitar la detección y aislamiento del HE4a a través de una interacción de afinidad específica con un ligando. El ligando puede ser cualquier molécula, receptor, contraceptor, anticuerpo o similar con el que el marcador de afinidad pueda interactuar a través de una interacción de unión

específica tal como se proporciona aquí. Tales péptidos incluyen, por ejemplo, poli-His o los péptidos de identificación antigénicos descritos en la patente de los Estados Unidos No. 5.011.912 y en Hopp et al., (1988 Bio/Technology 6: 1204), o la etiqueta del epítipo XPRESS^{MR} (Invitrogen, Carlsbad, CALIFORNIA). La secuencia de afinidad puede ser una etiqueta de seis histidinas como la suministrada, por ejemplo, por un vector pBAD/His (Invitrogen) o pQE-9 para permitir la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un huésped bacteriano, o, por ejemplo, la secuencia de afinidad puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) cuando se usa un huésped mamífero, por ejemplo, células COS-7. La etiqueta de HA corresponde a un epítipo definido por anticuerpo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson et al., 1984 Cell 37: 767).

Las proteínas de fusión HE4a pueden, en realizaciones particularmente preferidas y como se describe con mayor detalle a continuación, comprender además polipéptidos de región constante de inmunoglobulina añadidos a HE4a para facilitar la detección, aislamiento y/o localización de HE4a. El polipéptido de región constante de inmunoglobulina preferiblemente se fusiona con el extremo terminal C de un polipéptido HE4a. De acuerdo con la teoría no limitante, la inclusión de dominios de región constante de inmunoglobulina (Ig) en proteínas de fusión HE4a tal como se proporciona en la presente invención, pueden ofrecer ventajas, por ejemplo, las asociadas con las propiedades inmunogénicas/no inmunogénicas de regiones Ig particulares cuando se usan en huéspedes particulares (es decir, "propios" frente a "no propios"), o aquellos que facilitan el aislamiento y/o detección de una proteína de fusión. Estas y otras ventajas de las proteínas de fusión de Ig serán apreciadas por aquellos familiarizados con la técnica, basándose en la presente descripción. La preparación general de proteínas de fusión que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluyendo el dominio Fc) ha sido descrita, por ejemplo, por Ashkenazi et al., (PNAS USA 88: 10535, 1991) y Byrn et al., (Nature 344: 677, 1990). Se inserta una fusión génica que codifica la proteína de fusión HE4a: Fc en un vector de expresión apropiado. En ciertas realizaciones de la invención, se puede permitir que las proteínas de fusión HE4a: Fc se ensamblen como moléculas de anticuerpo, con lo que se forman enlaces disulfuro entre cadenas entre los polipéptidos Fc, produciendo proteínas de fusión dimericas HE4a.

Las proteínas de fusión HE4a que tienen afinidades de unión específicas para antígenos preseleccionados en virtud de polipéptidos de fusión que comprenden dominios de región V de inmunoglobulina codificados por secuencias de ADN enlazadas en el marco a secuencias que codifican HE4a también están dentro del alcance de la invención, incluyendo variantes y fragmentos de los mismos como se proporciona aquí. Las estrategias generales para la construcción de proteínas de fusión que tienen polipéptidos de fusión de región V de inmunoglobulina se describen, por ejemplo, en el documento EP 0318554; las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.132.405; 5.091.513; y 5.476.786.

Un ácido nucleico puede codificar también una proteína de fusión que comprende un polipéptido HE4a fusionado con otros polipéptidos que tienen propiedades de afinidad deseables, por ejemplo, una enzima tal como glutatión-S-transferasa. Como otro ejemplo, las proteínas de fusión HE4a también pueden comprender un polipéptido HE4a fusionado con un polipéptido de proteína A de *Staphylococcus aureus*; los ácidos nucleicos que codifican proteína A y su uso en la construcción de proteínas de fusión que tienen afinidad por regiones constantes de inmunoglobulina se describen generalmente, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.100.788. Otros polipéptidos de afinidad útiles para la construcción de proteínas de fusión HE4a pueden incluir proteínas de fusión de estreptavidina, como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 89/03422y WO 93/24631; y las patentes de Estados Unidos Nos. 5.489.528; 5.672.691; 5.168.049; 5,272,254 y en otras partes, y proteínas de fusión de avidina (véase, por ejemplo, el documento EP 511.747). Como se proporciona aquí y en las referencias citadas, las secuencias de polipéptidos HE4a pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos de fusión que pueden ser polipéptidos de fusión de longitud completa y que pueden alternativamente ser variantes o fragmentos de los mismos.

La presente divulgación también contempla proteínas de fusión HE4a que contienen secuencias polipeptídicas que dirigen la proteína de fusión al núcleo celular, para residir en el lumen del retículo endoplásmico (ER), para ser secretadas desde una célula a través de la ruta secretora clásica ER-Golgi (Véase, por ejemplo, von Heijne, J. Membrane Biol. 115: 195-201, 1990), que se incorporan en la membrana plasmática, para asociarse con un componente citoplasmático específico que incluye el dominio citoplasmático de un receptor de superficie de célula transmembrana o para dirigirse a una localización subcelular particular mediante cualquiera de una variedad de mecanismos de clasificación conocidos de proteínas intracelulares con los cuales los expertos en la técnica están familiarizados (véase, por ejemplo, Rothman, Nature 372: 55-63, 1994, Adrani et al., 1998 J. Biol. Chem. 273: 10317, y las referencias citadas allí).

La presente divulgación también se refiere a vectores y a "constructos de expresión recombinantes" que incluyen cualquier ácido nucleico que codifica para los polipéptidos HE4a para uso en la producción de polipéptidos HE4a y proteínas de fusión como se discutió anteriormente mediante técnicas recombinantes. Las proteínas HE4a pueden expresarse en células de mamífero, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células para producir tales proteínas utilizando ARN derivados de los constructos de ADN de la presente invención. Los vectores apropiados de clonación y expresión para uso con huéspedes procariontes y eucariotes se describen, por ejemplo, en Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, New York, (1989).

Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables

- que permiten la transformación de la célula huésped, por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina de *E. Coli* y el gen TRP1 de *S. Cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural secuencia abajo. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato-quinasa (PGK), factor α , fosfatasa ácida, o proteínas de choque térmico, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en fase apropiada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación del extremo terminal N que imparte características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.
- Los constructos de expresión útiles para el uso bacteriano se construyen insertando en un vector de expresión una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales de iniciación y terminación de traducción adecuadas en fase de lectura operable con un promotor funcional. El constructo puede comprender uno o más marcadores fenotípicos seleccionables y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del constructo del vector y, si se desea, proporcionar amplificación dentro del huésped. Los huéspedes procariontes adecuados para la transformación incluyen *E. Coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y varias especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, aunque también se pueden emplear otros como cuestión de elección. Se puede usar cualquier otro plásmido o vector, siempre y cuando sean replicables y viables en el huésped.
- Como un ejemplo representativo, pero no limitativo, los vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen bacteriano de replicación derivado de plásmidos comercialmente disponibles que comprenden elementos genéticos del vector de clonación conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Estas secciones de la "cadena principal" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural a expresar.
- Tras la transformación de una cepa huésped adecuada y el crecimiento de la cepa huésped hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado, si es un promotor regulado como se proporciona aquí, es inducido por medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un período adicional. Las células se recogen típicamente por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos y el extracto crudo resultante se retiene para purificación adicional. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden ser rotas por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica o uso de agentes de lisis celular; tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.
- Así, por ejemplo, los ácidos nucleicos como se divulga en la presente invención pueden incluirse en cualquiera de una variedad de constructos de vectores de expresión como un constructo de expresión recombinante para expresar un polipéptido HE4a. Tales vectores y constructos incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, por ejemplo, derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN viral, tales como virus vacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar y pseudorrabia. Sin embargo, cualquier otro vector puede usarse para la preparación de un constructo de expresión recombinante, siempre y cuando sea replicable y viable en el huésped.
- La secuencia o secuencias de ADN apropiadas se pueden insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados mediante procedimientos conocidos en la técnica. Las técnicas estándar para la clonación, aislamiento del ADN, amplificación y purificación, para reacciones enzimáticas que implican ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares, y diversas técnicas de separación son las conocidas y comúnmente empleadas por los expertos en la técnica. Se describen una serie de técnicas estándar, por ejemplo, en Ausubel et al. (1993 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc., & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA); Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning, Segunda Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); Maniatis et al. (1982 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY); y en otros lugares.
- La secuencia de ADN en el vector de expresión está operativamente enlazada a al menos una secuencia de control de expresión apropiada (por ejemplo, un promotor o un promotor regulado) para dirigir la síntesis de ARNm. Ejemplos representativos de tales secuencias de control de expresión incluyen al promotor de LTR o de SV40, el *lac* o *trp* de *E. Coli*, el promotor PL del fago lambda y otros promotores conocidos para controlar la expresión de genes en células procariontes o eucariotes o sus virus. Las regiones promotoras pueden seleccionarse de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos particulares mencionados incluyen *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, lambda P_R, P_L y *trp*. Los promotores eucariotes incluyen al inmediato temprano del CMV, timidina quinasa del HSV, SV40 temprano y tardío, los LTR de retrovirus y metalotioneína I de ratón. La selección del vector y promotor apropiados está dentro del nivel de conocimientos de expertos en la técnica y se describe en la presente invención la preparación de ciertos constructos de expresión recombinantes particularmente preferidos que comprenden al menos un promotor o promotor regulado unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido HE4a.
- Como se ha indicado anteriormente, en ciertas realizaciones el vector puede ser un vector viral tal como un vector retroviral. Por ejemplo, los retrovirus de los que pueden derivarse los vectores de plásmidos retrovirales incluyen, pero

no se limitan a, virus de la leucemia murina de Moloney, virus de la necrosis del bazo, retrovirus tales como virus del sarcoma de Rous, virus del sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de inmunodeficiencia humana, adenovirus, virus del sarcoma mieloproliferativo y virus del tumor mamario.

5 El vector viral incluye uno o más promotores. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, LTR retroviral; el promotor de SV40; y el promotor de citomegalovirus humano (CMV) descrito en Miller, et al., *Biotechniques* 7: 980-990 (1989), o cualquier otro promotor (por ejemplo, promotores celulares tales como promotores celulares eucariotas que incluyen, pero no se limitan a, la histona, pol III, y promotores de β -actina). Otros promotores virales que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, promotores de adenovirus, promotores de timidina quinasa (TK) y promotores de parvovirus B 19. La selección de un promotor adecuado será evidente para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas contenidas en la presente memoria, y puede ser de entre promotores o promotores regulados como se describió anteriormente.

15 El vector de plásmido retroviral se emplea para transducir líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas de células productoras. Ejemplos de células de empaquetamiento que pueden ser transfectadas incluyen, pero no se limitan a, PE501, PA317, ψ -2, ψ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψ CRE, ψ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y líneas de células DAN como se describe en Miller, *Human Gene Therapy*, 1: 5-14 (1990). El vector puede transducir las células de empaquetamiento a través de cualquier medio conocido en la técnica. Dichos medios incluyen, pero no se limitan a, electroporación, el uso de liposomas y la precipitación con fosfato de calcio. En una alternativa, el vector plasmídico retroviral puede encapsularse en un liposoma, o acoplarse a un lípido, y después administrarse a un huésped.

25 La línea celular productora genera partículas de vectores retrovirales infecciosos que incluyen la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos HE4a o las proteínas de fusión. Tales partículas de vector retroviral pueden utilizarse entonces para transducir células eucariotas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Las células eucariotas transducidas expresarán la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido HE4a o la proteína de fusión. Las células eucariotas que pueden ser transducidas incluyen, pero no se limitan a, células madre embrionarias, células de carcinoma embrionario, así como células madre hematopoyéticas, hepatocitos, fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales, células epiteliales bronquiales y otras líneas celulares adaptadas al cultivo.

30 Como otro ejemplo de un método en el que se usa un vector viral para preparar el constructo de expresión de HE4a recombinante, las células huésped son transducidas por un constructo viral recombinante dirigiendo la expresión de polipéptidos HE4a o proteínas de fusión para producir partículas virales que contienen polipéptidos HE4a expresados o proteínas de fusión que se derivan de porciones de una membrana celular huésped incorporada por las partículas virales durante el brote viral. En otra realización preferida, las secuencias de ácido nucleico que codifican HE4a se clonan en un vector lanzadera de baculovirus, que se recombina luego con un baculovirus para generar un constructo de expresión de baculovirus recombinante que se utiliza para infectar, por ejemplo, células huésped Sf9, como se describe en *Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology* Vol. 39, C. D. Richardson, Editor, Human Press, Totowa, NJ, 1995; Piwnica-Worms, "Expression of Proteins in Insect Cells Using Baculoviral Vectors", Sección II del Capítulo 16 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, 2ª Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, New York, New York, 1992, páginas 16-32 a 16-48.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a células huésped que contienen los constructos de expresión recombinantes de HE4a descritos anteriormente. Las células huésped son modificadas genéticamente (transducidas, transformadas o transfectadas) con los vectores y/o constructos de expresión de esta invención que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación, un vector lanzadera o un constructo de expresión. El vector o constructo puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las células huésped modificadas pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes particulares tales como genes que codifican polipéptidos HE4a o proteínas de fusión HE4a. Las condiciones de cultivo para células huésped particulares seleccionadas para la expresión, tales como temperatura, pH y similares, serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

55 La célula huésped puede ser una célula eucariótica superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procarionta, tal como una célula bacteriana. Ejemplos representativos de células huésped apropiadas de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, tales como *E. Coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, células fúngicas, tales como levadura; células de insecto, tales como S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*, células animales, tales como células CHO, COS o 293; adenovirus; células vegetales o cualquier célula adecuada ya adaptada a la propagación *in vitro* o así establecida de nuevo. La selección de un huésped apropiado se considera que está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

60 También se pueden emplear varios sistemas de cultivo celular de mamíferos para expresar proteína recombinante. Por lo tanto, la invención se dirige en parte a un método para producir un polipéptido HE4a recombinante, cultivando una célula huésped que comprende un constructo de expresión recombinante que comprende al menos un promotor operativamente enlazado a una secuencia de ácido nucleico que codifica una HE4a. En ciertas realizaciones, el promotor puede ser un promotor regulado como se proporciona en la presente memoria, por ejemplo, un promotor reprimible con tetraciclina. En ciertas realizaciones, el constructo de expresión recombinante es un constructo de

expresión viral recombinante como se proporciona aquí. Ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, Cell 23: 175 (1981) y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero comprenderán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuado, y también cualquier sitio necesario de unión a ribosomas, sitio de poliadenilación, sitios donante y aceptor de empalme, secuencias de terminación transcripcional y secuencias no transcritas que flanquean 5', por ejemplo, como se describe aquí en relación con la preparación de constructos de expresión de MRA. Se pueden usar secuencias de ADN derivadas del empalme de SV40, y sitios de poliadenilación para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos. La introducción del constructo en la célula huésped puede efectuarse mediante una variedad de métodos con los cuales los expertos en la técnica estarán familiarizados, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextrano o electroporación (Davis et al., 1986 Basic Methods in Molecular Biology).

Los polipéptidos antigénicos HE4a recombinantes expresados (o polipéptidos HE4a), o proteínas de fusión derivadas de los mismos, pueden ser útiles como inmunógenos en la forma de células huésped intactas; orgánulos intactos tales como membranas celulares, vesículas intracelulares u otros orgánulos celulares; o preparaciones celulares rotas, incluyendo, pero sin limitarse a homogeneizados celulares o lisados, vesículas de membrana unilamelares y multilamelares u otras preparaciones. Alternativamente, los polipéptidos antigénicos recombinantes expresados relacionados con la mesotelina (o polipéptidos de mesotelina) o proteínas de fusión pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos que incluyen sulfato de amonio o precipitación con etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad incluyendo cromatografía de inmunofinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina. Se pueden usar etapas de replegamiento de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, se puede emplear cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas finales de la purificación. Los polipéptidos antigénicos HE4a recombinantes expresados (o polipéptidos HE4a) o proteínas de fusión también pueden ser útiles como antígenos diana en cualquiera de una serie de configuraciones de ensayo para detección rutinaria de anticuerpos, que puede ser llevado a cabo fácilmente por los expertos en la técnica.

El polipéptido antigénico HE4a (o polipéptido HE4a) que es un inmunógeno para la producción de un anticuerpo específico a utilizar en el método de la presente invención puede por tanto ser un producto naturalmente purificado, o un producto de procedimientos sintéticos químicos, o producido por técnicas recombinantes a partir de un huésped procarionota o, preferentemente, un huésped eucariota. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden ser glicosilados o bien modificados postraduccionalmente como se conoce en la técnica y como se proporcionan en la presente memoria.

De acuerdo con la presente invención, se puede detectar un polipéptido antigénico HE4a humano soluble (o polipéptido HE4a) en una muestra biológica proporcionada mediante la obtención de una muestra de sangre de un sujeto. El sujeto o fuente biológica puede ser un animal humano o no humano. En ciertas realizaciones altamente preferidas la muestra biológica es suero, y en ciertas otras realizaciones altamente preferidas, la muestra biológica es plasma.

A manera de ilustración y no limitativa, en el contexto de la presente invención, una condición maligna puede referirse además a la presencia en un sujeto de células cancerosas que son capaces de secretar, eliminar, exportar o liberar un polipéptido antigénico HE4a (o un polipéptido HE4a) de tal manera que los niveles elevados de tal polipéptido son detectables en una muestra biológica del sujeto.

La invención detectará la presencia de células de carcinoma de ovario, incluyendo células de carcinoma de ovario primarias y metastásicas. Los criterios para clasificar una neoplasia como carcinoma de ovario son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bell et al., 1998, Br. J. Obstet, Gynaecol, 105: 1136, Meier et al., 1997 Anticancer Res. 17 (4B): 3019, Meier et al., 1997, Anticancer Res. 17 (4B): 2949, Cioffi et al., 1997 Tumori 83: 594 y las referencias citadas allí) como son el establecimiento y caracterización de líneas celulares de carcinoma de ovario humano de tumores primarios y metastásicos (por ejemplo, OVCAR-3, Amer. Type Culture Collection, Manassas, VA, Yuan et al., 1997, Gynecol, Oncol. 66: 378).

Como se proporciona aquí, el método de detección para detectar la presencia de una condición maligna en un sujeto ofrece el uso de un anticuerpo específico para el polipéptido antigénico HE4a que consiste de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11.

Los anticuerpos que son específicos para un polipéptido antigénico HE4a (o un polipéptido HE4a) se generan fácilmente como anticuerpos monoclonales o como antisueros policlonales, o pueden producirse como inmunoglobulinas (Ig) modificadas genéticamente que están diseñadas para tener propiedades deseables usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, los anticuerpos pueden incluir IgG recombinantes, proteínas de fusión quiméricas que tienen secuencias derivadas de inmunoglobulina o anticuerpos "humanizados" (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.693.762, 5.585.089, 4.816.567, 5.225.539, 5.530.101 y las referencias citadas en las mismas) que pueden ser utilizados para la detección de un polipéptido HE4a humano de acuerdo con la invención. Dichos anticuerpos pueden prepararse como se menciona aquí, incluyendo mediante

inmunización con polipéptidos HE4a como se describe más adelante. Por ejemplo, como se proporciona aquí, se describen secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos HE4a, de manera que los expertos en la técnica puedan preparar de forma rutinaria estos polipéptidos para su uso como inmunógenos. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos monoclonales tales como 2H5, 3D8 y 4H4, que se describen con mayor detalle más adelante, para practicar ciertos métodos de acuerdo con la presente invención.

El término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de los mismos tales como F(ab')₂ y fragmentos Fab, así como cualquier compañero de unión producido de forma natural o recombinante, que son moléculas que se unen específicamente a un polipéptido HE4a. Los anticuerpos se definen como "inmunoespecíficos" o se unen específicamente si se unen al polipéptido HE4a con un K_a mayor o igual a aproximadamente 10⁴ M⁻¹, preferiblemente mayor o igual a aproximadamente 10⁵ M⁻¹, más preferentemente mayor o igual a aproximadamente 10⁶ M⁻¹ y aún más preferiblemente mayor o igual a aproximadamente 10⁷ M⁻¹. Las afinidades de los compañeros de unión o anticuerpos se pueden determinar fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas por Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660 (1949). La determinación de otras proteínas como compañeros de unión de un polipéptido HE4a puede realizarse usando cualquiera de una serie de métodos conocidos para identificar y obtener proteínas que interactúan específicamente con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo, un sistema de detección doblemente híbrido de levadura tal como el descrito en la patente de Estados Unidos No. 5.283.173 y en la patente de Estados Unidos No. 5.468.614, o equivalente.

Los anticuerpos pueden prepararse generalmente por cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En una de tales técnicas, inicialmente se inyecta un inmunógeno que comprende un polipéptido HE4a, por ejemplo, una célula que tiene un polipéptido HE4a en su superficie o un polipéptido HE4a aislado, en un animal adecuado (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras), preferiblemente de acuerdo con una programación predeterminada que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo, y los animales son sangrados periódicamente. Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido HE4a pueden entonces purificarse a partir de tales antiseros por, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Los anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos HE4a o variantes de los mismos pueden prepararse, por ejemplo, utilizando la técnica de Kohler y Milstein (1976 Eur. J. Immunol., 6: 511-519), y mejoras de la misma. En resumen, estos métodos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido mesotelínico de interés). Tales líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, a partir de células de bazo obtenidas de un animal inmunizado como se ha descrito anteriormente. Las células del bazo se immortalizan entonces, por ejemplo, mediante la fusión con un compañero de fusión de células de mieloma, preferiblemente uno que sea singénico con el animal inmunizado. Por ejemplo, las células de bazo y las células de mieloma se pueden combinar con un agente promotor de fusión a la membrana tal como polietilenglicol o un detergente no iónico durante unos pocos minutos, y luego se siembran en placa a baja densidad en un medio selectivo que soporta el crecimiento de células híbridas, pero no células de mieloma. Una técnica de selección preferida utiliza la selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, normalmente de 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Las colonias individuales se seleccionan y se ensayan en cuanto a actividad de unión contra el polipéptido. Se prefieren los hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad. Los hibridomas que generan anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a polipéptidos HE4a se contemplan en la presente invención.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse a partir de los sobrenadantes de colonias de hibridomas en crecimiento. Además, se pueden emplear diversas técnicas para aumentar el rendimiento, tales como inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales pueden entonces ser cosechados del fluido de ascitis o de la sangre. Los contaminantes pueden eliminarse de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Por ejemplo, los anticuerpos pueden purificarse por cromatografía sobre Proteína G Proteína A inmovilizada o usando técnicas estándar.

En ciertas realizaciones, puede preferirse el uso de fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fab, que pueden prepararse usando técnicas estándar (por ejemplo, mediante digestión con papaína para producir fragmentos Fab y Fc). Los fragmentos Fab y Fc pueden separarse por cromatografía de afinidad (por ejemplo, sobre columnas de proteína A inmovilizadas), usando técnicas estándar. Véase, por ejemplo, Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston.

Las proteínas de fusión multifuncionales que tienen afinidades de unión específicas para antígenos preseleccionados en virtud de dominios de región V de inmunoglobulina codificados por secuencias de ADN enlazadas en el marco a secuencias que codifican diversas proteínas efectoras son conocidas en la técnica, por ejemplo, como se divulga en el documento EP-B1-0318554, la patente de Estados Unidos No. 5.132.405, la patente de Estados Unidos No. 5.091.513 y la patente de Estados Unidos No. 5.476.786. Tales proteínas efectoras incluyen dominios polipeptídicos que pueden usarse para detectar la unión de la proteína de fusión por cualquiera de una variedad de técnicas con las cuales los expertos en la técnica estarán familiarizados, incluyendo pero sin limitarse a una secuencia mimética de biotina (véase,

por ejemplo, Luo et al., 1998 *J. Biotechnol.*, 65: 225 y las referencias citadas allí), modificación covalente directa con una fracción marcador detectable, unión no covalente a una molécula informadora marcada específica, modificación enzimática de un sustrato detectable o inmovilización (covalente o no covalente) sobre un soporte de fase sólida.

5 Los anticuerpos monocatenarios para su uso en la presente invención también pueden generarse y seleccionarse mediante un método tal como despliegue en fagos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.223.409, Schlebusch et al., 1997 *Hybridoma* 16:47 y las referencias citadas allí). Brevemente, en este método, las secuencias de ADN se insertan en el gen III o gen VIII de un fago filamentoso, tal como M13. Varios vectores con sitios de clonación múltiple se han desarrollado para su inserción (McLafferty et al., *Gene* 128: 29-36, 1993, Scott y Smith, *Science* 249: 386-390, 1990, Smith y Scott, *Methods Enzymol.*, 217: 228-257, 1993). Las secuencias de ADN insertadas pueden ser generadas aleatoriamente o pueden ser variantes de un dominio de unión conocido para la unión a un polipéptido HE4a. Los anticuerpos monocatenarios pueden generarse fácilmente usando este método. Generalmente, los insertos codifican de 6 a 20 aminoácidos. El péptido codificado por la secuencia insertada se muestra en la superficie del bacteriófago. Los bacteriófagos que expresan un dominio de unión para un polipéptido HE4a se seleccionan mediante unión a un polipéptido HE4a inmovilizado, por ejemplo, un polipéptido recombinante preparado usando métodos bien conocidos en la técnica y secuencias codificantes de ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria. Los fagos no unidos se eliminan mediante un lavado, que contiene típicamente Tris 10 mM, EDTA 1 mM, y sin sal o con una concentración baja de sal. Los fagos unidos se eluyen con un regulador que contiene sal, por ejemplo. La concentración de NaCl se incrementa de una manera escalonada hasta que todos los fagos son eluidos. Típicamente, la unión del fago con mayor afinidad será liberada por concentraciones de sal más altas. Los fagos eluidos se propagan en el huésped bacteriano. Pueden realizarse rondas adicionales de selección para seleccionar una escasa unión de fagos con una afinidad alta. A continuación, se determina la secuencia de ADN del inserto en el fago de unión. Una vez que se conoce la secuencia de aminoácidos predicha del péptido de unión, puede elaborarse péptido suficiente para uso aquí como un anticuerpo específico para un polipéptido HE4a por medios recombinantes o sintéticamente. Se utilizan medios recombinantes cuando el anticuerpo se produce como una proteína de fusión. El péptido también puede generarse como un arreglo en tándem de dos o más péptidos similares o no similares, con el fin de maximizar la afinidad o unión.

Para detectar un determinante antigénico reactivo con un anticuerpo específico para un polipéptido HE4a, el reactivo de detección es típicamente un anticuerpo, que puede prepararse como se describe en el presente documento. Hay una variedad de formatos de ensayo conocidos por los expertos en la técnica para usar un anticuerpo para detectar un polipéptido en una muestra, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión y otras técnicas. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Weir, D.M., *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Blackwell Scientific, Boston. Por ejemplo, el ensayo puede realizarse en un formato de transferencia Western, en el que una preparación de proteína de la muestra biológica se somete a electroforesis en gel, se transfiere a una membrana adecuada y se deja reaccionar con el anticuerpo. La presencia del anticuerpo en la membrana puede entonces detectarse usando un reactivo de detección adecuado, como es bien conocido en la técnica y descrito a continuación.

40 En otra realización, el ensayo implica el uso de un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido para unirse al polipéptido HE4a objetivo y retirarlo del resto de la muestra. El polipéptido HE4a unido puede entonces detectarse usando un segundo anticuerpo reactivo con un determinante antigénico de un polipéptido HE4a distinto, por ejemplo, un reactivo que contiene una fracción indicadora que puede detectarse. Como ejemplo no limitativo, de acuerdo con esta realización, el anticuerpo inmovilizado y el segundo anticuerpo que reconocen determinantes antigénicos distintos pueden ser cualquiera de los dos anticuerpos monoclonales descritos aquí seleccionados de los anticuerpos monoclonales 2H5, 3D8 y 4H4. Alternativamente, se puede utilizar un ensayo competitivo, en el que un polipéptido HE4a está marcado con una fracción indicadora detectable y se deja unirse al anticuerpo específico del polipéptido HE4a inmovilizado después de la incubación del anticuerpo inmovilizado con la muestra. La medida en que los componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado al anticuerpo es indicativa de la reactividad de la muestra con el anticuerpo inmovilizado y, como resultado, indicativo del nivel de HE4a en la muestra.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos en la técnica al que se puede unir el anticuerpo, tal como un pozo de ensayo en una placa de microtitulación, un filtro de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser una perla o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El anticuerpo puede inmovilizarse sobre el soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica.

60 En ciertas realizaciones preferidas, el ensayo para la detección del polipéptido antigénico HE4a en una muestra es un ensayo tipo sándwich de dos anticuerpos. Este ensayo puede realizarse poniendo primero en contacto un anticuerpo específico de un polipéptido HE4a (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal tal como 2H5, 3D8 o 4H4) que se ha inmovilizado sobre un soporte sólido, comúnmente el pozo de una placa de microtitulación, con la muestra biológica, de modo que se permite que una molécula soluble de origen natural presente en la muestra y que tenga un determinante antigénico que sea reactivo con el anticuerpo se una al anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente es generalmente suficiente) para formar un complejo antígeno-anticuerpo S o un complejo inmune. Los constituyentes no unidos de la muestra se retiran entonces de los complejos inmunes

5 inmovilizados. A continuación, se añade un segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a, en donde el sitio de combinación del antígeno del segundo anticuerpo no inhibe competitivamente la unión del sitio de combinación del antígeno del primer anticuerpo inmovilizado a un polipéptido HE4a (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal tal como 2H5, 3D8 o 4H4 que no es el mismo que el anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre el soporte sólido). El segundo anticuerpo puede marcarse de forma detectable tal como se proporciona en el presente documento, de manera que pueda ser detectado directamente. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede detectarse indirectamente mediante el uso de un anti-anticuerpo secundario marcado en forma detectable (o "segunda etapa"), o utilizando un reactivo de detección específico tal como se proporciona en la presente memoria. El presente método de la invención no se limita a ningún procedimiento de detección particular, ya que aquellos que tienen familiaridad con inmunoensayos apreciarán que hay numerosos reactivos y configuraciones para detectar inmunológicamente un antígeno particular (por ejemplo, un polipéptido de mesotelina) en un inmunoensayo tipo sándwich de dos anticuerpos.

15 En ciertas realizaciones preferidas de la invención usando el ensayo tipo sándwich de dos anticuerpos descrito anteriormente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo policlonal. En ciertas otras realizaciones de la invención, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo policlonal. En ciertas otras realizaciones de la invención, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo monoclonal. En ciertas otras realizaciones altamente preferidas de la invención, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, en estas realizaciones se debe observar que los anticuerpos monoclonales 2H5, 3D8 y 4H4 como se proporcionan en la presente memoria reconocen determinantes antigénicos distintos y no competitivos (por ejemplo, epítomos) sobre polipéptidos HE4a, de tal manera que se puede emplear cualquier combinación en pares de estos anticuerpos monoclonales. En otras realizaciones preferidas de la invención, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a y/o el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a puede ser cualquiera de los tipos de anticuerpos conocidos en la técnica y referidos aquí, por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, proteínas de fusión de la región V de inmunoglobulina o anticuerpos de cadena sencilla. Los familiarizados con la técnica apreciarán que la presente invención abarca el uso de otras formas de anticuerpo, fragmentos, derivados y similares en los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria.

35 En ciertas realizaciones particularmente preferidas, el segundo anticuerpo puede contener una fracción o marcador indicador detectable tal como una enzima, un colorante, un radionúclido, un grupo luminiscente, un grupo fluorescente o una biotina, o similares. La cantidad del segundo anticuerpo que permanece unida al soporte sólido se determina entonces usando un método apropiado para la fracción o marcador indicador detectable específico. Para los grupos radiactivos, los métodos de conteo de centelleo o autorradiográficos son generalmente apropiados. Los conjugados anticuerpo-enzima pueden prepararse usando una variedad de técnicas de acoplamiento (para revisión véase, por ejemplo, Scouten, W.H., *Methods in Enzymology* 135: 30-65, 1987). Se pueden usar métodos espectroscópicos para detectar colorantes (incluyendo, por ejemplo, productos colorimétricos de reacciones enzimáticas), grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. La biotina se puede detectar usando avidina o estreptavidina, acoplada a un grupo informador diferente (comúnmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos informadores enzimáticos pueden detectarse generalmente mediante la adición de sustrato (generalmente durante un período de tiempo específico), seguido por análisis espectroscópico, espectrofotométrico u otro análisis de los productos de reacción. Pueden usarse estándares y adiciones estándar para determinar el nivel de polipéptido de mesotelina en una muestra, usando técnicas bien conocidas.

50 Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se refiere en parte al hallazgo sorprendente de que las formas solubles de los polipéptidos antigénicos HE4a ocurren naturalmente en sujetos, incluyendo niveles elevados de tales polipéptidos HE4a solubles en sujetos que tienen ciertos carcinomas.

55 Un método para detectar la presencia de un carcinoma de ovario de acuerdo con la presente invención puede mejorarse adicionalmente mediante la detección de más de un marcador asociado a un tumor en una muestra biológica de un sujeto. Por consiguiente, en ciertas realizaciones la presente invención proporciona un método de detección que, además de detectar la reactividad de un componente de muestra soluble de origen natural con un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a, también incluye la detección de al menos un marcador soluble adicional de una condición maligna usando métodos establecidos como se conoce en la técnica y se proporcionan en la presente memoria. Como se ha indicado anteriormente, actualmente hay varios antígenos asociados a tumores solubles que son detectables en muestras de fluidos biológicos obtenidos fácilmente, por ejemplo, polipéptidos de mesotelina humanos, que incluyen polipéptidos tales como el nuevo polipéptido antigénico relacionado con mesotelina soluble (MRA) descrito en Scholler et al. (1999 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96: 11531) y como también se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 09/513.597.

65 Tal como se proporciona en la presente memoria, un "polipéptido de mesotelina" es un polipéptido soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye el péptido:

EVEKTACPSGKKAREIDES (SEQ ID NO: 14)

y que además tiene al menos un determinante antigénico reactivo con al menos un anticuerpo que tiene un sitio de combinación del antígeno que inhibe competitivamente la unión inmunespecífica del MAb K-1 (Chang et al., 1996 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 136; MAb K-1 está disponible, por ejemplo, a través de Signet Laboratories, Inc., Dedham, MA) o de anticuerpos monoclonales OV569, 4H3, 3G3 o 1A6 como se proporciona en USSN 09/513.597.

Por lo tanto, estos antígenos asociados a tumores solubles adicionales para uso de acuerdo con la presente invención pueden incluir, pero no están limitados a, antígeno mesotelina y relacionado con mesotelina, CEA, CA125, sialil TN, SCC, IPS y PLAP, (véase, por ejemplo, Bast et al., 1983 N. Eng. J. Med. 309: 883, Lloyd et al., 1997 Int. J. Canc. 71: 842, Sarandakou et al., 1997 Acta Oncol. 36: 755; Sarandakou et al., 1998 Eur. J. Gynaecol, Oncol. 19:73, Meier et al., 1997 Anticanc Res. 17 (4B): 2945, Kudoh et al., 1999 Gynecol Obstet Invest. 47:52, et al., 1997, Br. J. Obstet, Gynaecol, 104: 1024, Bell et al., 1998, Br. J. Obstet, Gynaecol, 105: 1136, Cioffi et al., 1997, Tumori 83: 594, Meier et al (1997) Anticanc Res. 17 (4B): 3019). Como se indicó aquí anteriormente, un antígeno adicional asociado a un tumor soluble para uso de acuerdo con la presente invención, es CA-125.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Detección por PCR en tiempo real de la expresión de HE4a en muestras humanas

Se obtuvieron ciento cincuenta y ocho biopsias de tejido humano, o muestras de ARN de biopsias, de acuerdo con los procedimientos aprobados por las juntas de revisión institucionales de la Universidad de Washington, el Hospital Sueco y el Centro de Investigación de Cáncer Fred Hutchinson, todos de Seattle, Washington. Se incluyeron muestras de tejidos normales (glándula suprarrenal, médula ósea, cerebro, colon, endometrio, estómago, corazón, riñón, hígado, pulmón, pulmón, glándula mamaria, músculo esquelético, músculo esquelético, miometrio, nervio periférico, preparaciones de linfocitos de sangre periférica, glándula salival, piel, intestino delgado, médula espinal, bazo, bazo, tráquea, timo, útero, cultivo de linfocitos de sangre periférica y 40 ovarios normales), de lesiones ováricas benignas (13 cistoadenomas serosos), de 2 tumores de ovario de malignidad límite, de 3 carcinomas de ovario mucinosos en estadio I, 3 carcinomas de ovario serosos en estadio I, 37 carcinomas de ovario serosos en estadio III, 7 carcinomas de ovario serosos en estadio IV, 6 muestras de tejido de carcinoma de ovario metastásico y 2 tubos de mujeres con cáncer de ovario. Todas las muestras de tejido se obtuvieron de las mujeres antes de la terapia, y una porción de cada tumor se colocó inmediatamente en nitrógeno líquido, con el resto de la muestra sometida a la histología de rutina. Sólo se utilizaron las muestras que en el examen histopatológico estaban compuestas de más del 80% de células tumorales, y que no tenían necrosis, para la hibridación y experimentos de PCR en tiempo real. También se incluyeron ARN de un cultivo epitelial de superficie ovárica (OSE, obtenido de B. Karlan, Cedars Sinai Hospital, Los Ángeles, CA) y tres muestras adicionales de OSE (obtenidas de R. Hernández, Universidad de Washington, Seattle, WA). En total, se reservaron 151 (94 tejidos no malignos y 57 cánceres) para la confirmación por PCR cuantitativa en tiempo real de la sobreexpresión de genes de interés, incluyendo HE4a como se describe a continuación.

La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó como sigue. Los cebadores de PCR en tiempo real de HE4 fueron:

AGCAGAGAAGACTGGCGTGT (directo) [SEQ ID NO: 15] y

GAAAGGGAGAAGCTGTGGTCA (inverso) [SEQ ID NO: 16].

Estos cebadores generaron un producto de PCR de 427 pb de longitud. El ARN total se transcribió inversamente usando cebador oligo-dT y transcriptasa inversa Superscript II (Life Technologies, Inc., Bethesda, MD) según lo especificado por el fabricante. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando una máquina ABI7700 (PE Biosystems, Foster City, CA) y el protocolo SYBR-Green. Cinco duplicados de una dilución en serie de dos veces de una preparación de ADNc de glóbulos blancos sirvieron como plantilla para la amplificación del patrón (S31iii125, que en experimentos anteriores se demostró que se expresaba universalmente en tejidos normales y malignos, véase Schummer et al. 1999 Gene 1999).

Número de acceso del GenBank: U61734, cebador directo:

CGACGCTTCTTCAAGGCCAA, [SEQ ID NO: 17]

Cebador inverso: ATGGAAGCCCAAGCTGCTGA [SEQ ID NO: 18].

Los controles negativos consistían en ARN total de un carcinoma de ovario que se transcribió inversamente sin la enzima y un pozo que contenía todos los componentes de la PCR sin ninguna plantilla. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Cada ensayo se analizó en un gel de agarosa para detectar la presencia de una única banda de PCR para eliminar bandas artificiales. Los resultados para cada placa de 96 pozos se analizaron usando un software

(Sequence Detector^{MR}) proporcionado por el fabricante de la máquina de PCR; este análisis permite la determinación de los niveles de expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés (HE4a) con respecto al patrón.

Los valores de expresión, como se muestra en la Figura 1, se representaron en unidades arbitrarias con respecto al patrón interno y no reflejaban cantidades absolutas de moléculas de ARNm en unidades de medida estándar. Basándose en la amplitud de los niveles medios de expresión de HE4a y la comparación de estos valores con los de otros genes conocidos (notablemente beta actina como un gen altamente expresado), la Figura 1 muestra que los transcritos que codifican HE4a se expresaron en niveles relativos de moderados a altos.

10 Ejemplo 2

Clonación y expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican HE4a

15 Amplificación del ADNc del constructo de fusión de HE4a a partir del clon de ADNc de HE4a de alto rendimiento: La secuencia de ADNc para HE4 (SEQ ID NO: 8) publicada originalmente por Kirchoff et al., (1991) se depositó en el GenBank, acceso # X63187 y proporcionó la base para el diseño del cebador de oligonucleótidos para clonar ADNc que codifica HE4a (SEQ ID NO: 10), como se describe en la presente memoria. El ADNc para HE4a, identificado y aislado como un producto génico expresado diferencialmente utilizando matrices de ADNc de alto rendimiento, se clonó en pSPORT como un fragmento de 840 pares de bases. Este ADNc se usó como plantilla en reacciones de PCR para
20 amplificar HE4a en una forma apropiada para crear genes de proteína de fusión sintética, como se describe en este Ejemplo.

Una porción de la secuencia codificante de HE4 (SEQ ID NO: 8) parecía codificar un presunto péptido señal secretor; por lo tanto, este péptido guía nativo se usó en constructos iniciales para preservar tanto como sea posible la estructura de la molécula. Además, debido a que HE4a era relativamente pequeño y la secuencia no contenía ninguna característica estructural inusual tal como dominios transmembrana o secuencias diana citoplasmáticas, se diseñó una proteína de fusión que incorporaba el producto génico HE4a completo fusionado al dominio Fc de IgG1 humano. Se diseñaron cebadores que codificaron los sitios de restricción apropiados para clonación y crearon las necesarias fusiones en el marco de los dominios de la proteína para el constructo final. El cebador 5' (SEQ ID NO: 1, o HE4-5') era uno de 39 unidades monoméricas que incluía un sitio HindIII, una secuencia de Kozak para mejorar la expresión adyacente al primer ATG y una porción del péptido líder HE4a basado en la secuencia previamente publicada de HE4. El cebador 3' (SEQ ID NO: 2, o HE4-3'-1) era uno de 36 unidades monoméricas que incluía un sitio BamHI en el marco para la fusión al ADNc de la cola de Ig humana, con el extremo 3' de la secuencia que codifica HE4 truncada justo antes del codón de PARADA. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron usando estos dos cebadores a 50 pmoles y 1 ng de plásmido HE4/pSPORT como plantilla. Cincuenta reacciones de microlitro también incluyeron 2,5 unidades (0,5 ml) de ADN Polimerasa ExTaq (TaKaRa Shuzo Biomedical, Otsu, Shiga, Japón), reguladores y nucleótidos diluidos de acuerdo con las instrucciones del inserto del envase. Las reacciones se amplificaron durante 30 ciclos, con un perfil de amplificación de 94°C, 30 segundos, 60°C, 30 segundos y 72°C, 30 segundos. Se obtuvieron productos de PCR del tamaño esperado (aproximadamente 400 pares de bases) para el HE4 de longitud completa.

40 Estos fragmentos se digirieron por restricción, se purificaron y se ligaron en el plásmido de expresión de mamífero digerido apropiadamente que contenía ya el inserto de IgG1 humana. Los productos de ligación se transformaron en células bacterianas DH5 α y se seleccionaron los transformantes para detectar la presencia de insertos de genes de fusión HE4-hlgG1. El ADN de plásmido de varios aislamientos se secuenció después usando el kit de secuenciación del terminador del ciclo BigDye (PE Biosystems, Foster City, CA) en un secuenciador ABI Prism 310 (PE Biosystems). Además, el ADN del plásmido de estos aislamientos también se transfectó mediante transfecciones transitorias de DEAE-Dextrano de células COS7 como se describe (Hayden et al., 1994, Ther Immunol., 1:3). Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon después de 72 h y se detectaron mediante inmunoprecipitación con agarosa de proteína A, electroforesis en SDS-PAGE reductora y transferencia Western (Figura 2). Las transferencias de Western se probaron usando un conjugado de cabra anti-IgG humana en proporción 1:5000, seguido por el desarrollo de ECL.

Los resultados del análisis de secuencia indicaron que la secuencia codificante obtenida de HE4a (SEQ ID NO: 10) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 11) difirió de las secuencias publicadas de codificación y traducida de HE4 (SEQ ID NO: 8) y se tradujeron las secuencias (SEQ ID NO: 9) en varias posiciones. Por lo tanto, también se obtuvieron secuencias a partir de ADNc derivadas de epidídimo humano normal y de varias líneas celulares tumorales y ARN de tumor primario, y se confirmaron la secuencia codificante de HE4a como se establece en la SEQ ID NO: 10 y la secuencia de aminoácidos codificada deducida expuesta en la SEQ ID NO: 11.

Clonación de ADNc de HE4 a partir de líneas celulares tumorales: Se preparó ARN a partir de varias líneas celulares de tumores de ovario, incluyendo 4007 y OVCAR3 (véase, por ejemplo, Hellstrom et al., 2001 Canc. Res. 61: 2420), usando Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se preparó usando 1-3 μ g de ARN, hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa Superscript II (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de HE4 se amplificó por PCR a partir del ADNc cebado aleatoriamente en reacciones de 50 μ l que contenían 1 μ g de ADNc, 2,5 unidades (0,5 ml) de ADN polimerasa ExTaq (TaKaRa Shuzo Biomedical, Otsu, Shiga, Japón), reguladores y nucleótidos diluidos de acuerdo con las instrucciones del inserto y los cebadores específicos HE4-5' y HE4-3'-1. Las reacciones se amplificaron durante 30 ciclos, con un

perfil de amplificación de 94°C, 30 segundos, 60°C, 30 segundos y 72°C, 30 segundos. Los oligonucleótidos HE4-5' y HE4-3'-1 se utilizaron de nuevo para la amplificación por PCR de HE4 a partir de los ADNc derivados de tumores. Se obtuvieron productos de PCR del tamaño esperado para el HE4 de longitud completa y los fragmentos se clonaron en vectores pT-AdvanTAge (Clontech, Palo Alto, CA) para análisis de secuencia. Se secuenciaron los clones con insertos como se ha descrito anteriormente, y se encontró que los fragmentos de PCR de las muestras de ARN tumoral codificaban la secuencia de HE4a idéntica a los clones originales descritos anteriormente; estas secuencias de HE4a difirieron de la secuencia publicada para HE4 (Kirchhoff et al., 1991). De forma similar, se obtuvo la secuencia codificante de HE4a a partir de epidídimo normal (SEQ ID NO: 10) y a partir de los ADNc de tejido tumoral primario (SEQ ID NO: 12), y por lo tanto coincidió con la nueva secuencia de HE4a descrita anteriormente, pero difería de la secuencia de HE4 (SEQ ID NO: 8) de Kirchhoff et al. (1991).

Producción de proteína de fusión HE4Is. El constructo de ADNc de HE4-hlgG1 (SEQ ID NO: 7) se insertó como un fragmento HindIII-XbaI en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión de mamífero pD18, un derivado de pCDNA 3 como se describió anteriormente (Hayden et al., 1996 Tissue Antigens 48: 242). Los constructos se transfectoron inicialmente mediante transfecciones transitorias de DEAE-Dextrano como se describe (Hayden et al., 1994, Ther. Immunol., 1: 3). Se preparó ADN de plásmido de varios aislados y se usó para transfectar transitoriamente células COS7. Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon después de 72 h y se detectaron por inmunoprecipitación con agarosa de proteína A, electroforesis en SDS-PAGE reducida y transferencia Western (Figura 2).

Se usaron células CHO-DG44 (Urlaub et al., 1986, Somat. Cell. Gen. 12: 55) para construir líneas estables que expresan altos niveles de las proteínas de fusión de interés. Se crearon líneas CHO estables que expresaban HE4Ig mediante electroporación de alta copia en el vector pD18 (Hayden et al., 1996, Tissue Antigens 48: 242, Barsoum, 1990 DNA Cell Biol. 9: 293) y selección de clones resistentes a metotrexato por dilución limitativa en medio Excell 302 CHO (JRH Biosciences, Denver, PA) que contenía insulina recombinante (Life Technologies, Gaithersburg, MD), piruvato sódico (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), glutamina (Irvine Scientific), aminoácidos no esenciales 2X para MEM (Irvine Scientific) y metotrexato 100 nM (Sigma, St. Louis, MO). Los sobrenadantes de cultivo de clones resistentes se ensayaron a continuación mediante ELISA tipo sándwich de IgG para detectar líneas de alta producción. Los sobrenadantes gastados se cosecharon a partir de cultivos a gran escala y se purificó HE4Ig mediante cromatografía de afinidad de proteína A sobre una columna de 2 ml de proteína A-agarosa (Repligen, Cambridge, MA). La proteína de fusión se eluyó de la columna como fracciones de 0,8 ml en regulador de citrato 0,1 M (pH 2,7) y se neutralizó usando 100 µl de base Tris 1 M (pH 10,5). Las fracciones eluidas se ensayaron por absorbancia a 280 nm, y las fracciones que contenían proteína de fusión se reunieron, se dializaron durante la noche en varios litros de PBS (pH 7,4) y se esterilizaron por filtración a través de unidades filtrantes de jeringa de 0,2 µm (Millipore, Bedford, MA).

Se usaron transfectantes estables para producir suficiente proteína para la inmunización de ratones BALB/c. Los ratones se inyectaron inicialmente intraperitonealmente (IP) con 10 microgramos de proteína de fusión purificada HE4-hlgG1 a intervalos de 4 semanas. Después de una inyección primaria y dos refuerzos usando este protocolo de inmunización, a los ratones se les inyectó posteriormente 10 µg de proteína más adyuvante TiterMax Gold en forma IP y luego SC para dos refuerzos más antes de la recolección de los bazos. Se elaboraron los hibridomas fusionando células de bazo de ratones inmunizados con el compañero de mieloma P3-X63-Ag8-653.

Análisis Western de protones de fusión HE4Ig. Las muestras de proteínas se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE en un gel Tris/Bis NOVEX al 10% (Invitrogen, San Diego CA) y se transfirieron mediante transferencia semi-seca sobre membranas de PVDF (Millipore). Las membranas se bloquearon para impedir la unión no específica de anticuerpos por incubación en leche en polvo sin grasa al 5% (Carnation) en PBS/NP-40 al 0,25% o TBS-T (Tris HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 0,15 M y Tween-20 al 0,05%) durante la noche a 4°C. Las membranas se incubaron con anti-IgG humana de cabra-HRP (1/10.000) o con HRP-estreptavidina (1:5000) (Caltag) en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente o 4°C, con agitación suave. Después de dos enjuagues y cuatro lavados con TBST, la membrana se incubó en reactivo ECL^{MR} (Amersham, Little Chalfont, UK) durante 60 s y exposición a una película de autorradiografía para la visualización de las bandas (Figura 2). Se recogieron muestras de proteína de fusión de sobrenadantes de cultivo o de eluatos de proteína A de muestras purificadas y la proteína A precipitó usando 50 µl de agarosa de proteína A (Repligen, Cambridge, MA). Los inmunoprecipitados se lavaron y se resuspendieron en SDS-PAGE reduciendo el regulador de carga de la muestra, se sometieron a ebullición y después se resolvieron mediante electroforesis SDS-PAGE en un gel Tris/Bis NOVEX al 10% (Invitrogen, San Diego CA) y se transfirieron mediante transferencia semi-seca sobre membranas de PVDF (Millipore). Las membranas se bloquearon para impedir la unión de anticuerpos no específicos por incubación en leche en polvo desnatada al 5% (Carnation) en PBS/NP-40 al 0,25% o TBS-T (Tris HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 0,15 M y Tween-20 al 0,05%) desde 1 hora hasta toda la noche a 4°C. Las membranas se incubaron con HRP-anti-IgG humana de cabra (1/10.000), se lavaron en TBS-T y se expusieron al reactivo ECL^{MR} (Amersham, Little Chalfont, RU) durante 60 s. Las transferencias de ECL se expusieron luego a una película de autorradiografía para la visualización de las bandas. La Figura 2, carril 1 contenía muestras inmunoprecipitadas del sobrenadante de células COS7 transfectadas con CTLA4-hlgG1, los carriles 3 y 4 contenían sobrenadantes del cultivo de la proteína de fusión HE4-hlgG1 y el carril 5 contenía sobrenadante de COS transfectado simulado. La proteína de fusión HE4-hlgG1 opera a un Mr aparente de aproximadamente 48 kDa sobre geles reducidos o transferencias Western, mayores a los 39 kDa esperados con base en la secuencia de aminoácidos pronosticada, lo que sugiere que la molécula estaba glicosilada.

Construcción y expresión de proteínas de fusión HE4-mlgG2a: Se fabricó también un constructo similar al gen de fusión HE4-hlgG1, pero sustituyendo el dominio IgG2a de murino por el fragmento Fc de IgG humana. Se usó la cola alternativa para que las inmunizaciones de ratones no se vieran afectadas por la inmunogenicidad del dominio de fusión de cola de Ig humana. Los clones de ADNc existentes de la cola mlgG2a estaban fuera del marco con respecto al clon de HE4a descrito anteriormente, de modo que se amplificó nuevamente el casete -mlgG2a a partir de tales plásmidos para crear un dominio de fusión en el marco. El cebador sentido directo utilizado fue MlgG2aBAMIF:

5'-gtgtcggatccgagcccagagggcccacaatcaag-3' [SEQ ID NO: 19],

mientras que el cebador antisentido inverso se denominó mlgG2a3'Xba+S:

5'-gtgtttctagattatcattaccggagtgccgggagaagctc-3' [SEQ ID NO: 20].

La plantilla utilizada contenía CTLA4 murino fusionado al dominio Fc de IgG2a murino, pero con el sitio de restricción en la unión de fusión fuera del marco con respecto al espaciado del codón. Los nuevos oligonucleótidos crearon un desplazamiento del marco, alterando el marco de lectura en el sitio BamHI de modo que el gen de fusión con HE4 resultara en la expresión de una proteína de fusión HE4-mlgG2a completa. Los productos de PCR se amplificaron, subclonaron y procesaron como se describe para los genes de fusión humanos. Las moléculas se subclonaron en el vector de expresión pD18 de mamífero, se generaron clones de CHO estables y se expresó la proteína de fusión como se describió anteriormente para las proteínas de fusión de HE4-IgG1 humana.

Ejemplo 3

Anticuerpos monoclonales específicos para he4a

Generación de los MAb anti-HE4a. En los experimentos iniciales, se inmunizaron varios ratones BALB/c con proteínas de fusión HE4a-hlgG preparadas como se ha descrito anteriormente, con y sin adyuvante. Aunque se observaron títulos altos de anticuerpos en estos ratones, los anticuerpos no eran específicos para HE4a, ya que se observaron títulos igualmente altos frente a una proteína de fusión de control que tenía la cola hlgG (fusión CTLA4-hlg). Por lo tanto, se utilizó la proteína de fusión HE4a-mlgG para la inmunización. La Figura 3 ilustra los resultados de dos inmunizaciones que condujeron a anticuerpos de alto título contra HE4a en dos ratones BALB/c (1605 y 1734) que fueron cada uno inmunizados dos veces con HE4a-mlgG más adyuvante (TiterMax®, CytRx Corp., Norcross, GA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, administradas por vía subcutánea en la cola. Los hibridomas específicos de HE4a se prepararon mediante metodologías estándar utilizando células de bazo de ratones que exhiben altos títulos de anticuerpo específicos de HE4a. La Figura 4 muestra la prueba inicial, por ELISA, de hibridomas producidos usando células de bazo de ratón 1605 (cuyos datos de suero se muestran en la Figura 3). Tres pozos mostraron alta reactividad frente a HE4a-hlg. Posteriormente se aislaron de estos pozos tres hibridomas, 2H5, 3D8 y 4H4, después de la clonación por dilución limitante. Se descubrió que los hibridomas 2H5 y 3D8 identificaban epítomos diferentes de acuerdo con ensayos de competición.

Construcción y aplicación de un ELISA para diagnóstico tumoral. Se construyó un ELISA doble determinante ("sándwich"), usando un enfoque similar al empleado para realizar un ELISA que mide mesotelina/MPF y antígenos relacionados en suero y otros fluidos (Scholler et al., Proc. Nat. Acad. USA 96, 11531, 1999) usando los dos MAb 2H5 y 3D8 mencionados anteriormente. La Figura 5 muestra un ejemplo de una curva estándar, preparada usando HE4a-hlgG diluida en medio de cultivo DMEM. Como se ilustra en la figura, se detectó una señal a nivel de 1 ng de HE4a-hlgG. La Figura 5 muestra también que el medio de cultivo no diluido de una línea de carcinoma de ovario (4007) produjo una señal detectable. La Figura 6 muestra que el fluido ascítico de un paciente (denominado OV50) diagnosticado con carcinoma de ovario contenía antígeno HE4a que todavía era detectable a la dilución más alta probada (1:1280).

El ELISA de HE4a inicial se mejoró estableciendo las cantidades óptimas de los dos anticuerpos utilizados. Uno de estos anticuerpos, 2H5, se biotiniló y el otro anticuerpo 3D8 se inmovilizó permitiendo que se uniera al fondo de la placa de ensayo; las dosis respectivas de los dos anticuerpos monoclonales para el ensayo fueron 2,5 y 100 µg/ml. Excepto por los diferentes MAb y las dosis de los MAb utilizados, como se ha indicado, los métodos de ensayo eran idénticos a los descritos para mesotelina/MPF y moléculas relacionadas (Scholler et al., 1999 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96: 11531).

Las pruebas preliminares de sueros de pacientes con carcinoma de ovario y una variedad de controles indicaron que la proteína HE4a estaba elevada en una fracción significativa de pacientes con carcinoma de ovario, incluyendo pacientes con enfermedad temprana, y no en sueros de control para los cuales el fondo es muy bajo. En un estudio utilizando el ensayo de ELISA tipo sándwich descrito anteriormente y muestras de suero codificadas de aproximadamente 400 pacientes (proporcionadas por el Hospital Sueco, Seattle, WA), todas las muestras de pacientes diagnosticados con cáncer de ovario fueron correctamente calificadas como positivas por el ELISA de HE4a, que predijo además que no hay falsos positivos. Por lo tanto, se contempla, sin desear estar limitado por la teoría, que el ensayo de la proteína HE4a en los sueros y otros fluidos corporales puede proporcionar de este modo un complemento clínicamente beneficioso para los ensayos de diagnóstico existentes para el carcinoma de ovario (tal como CA125). Además, aunque el ELISA ha sido hasta ahora investigado con respecto a su capacidad para ayudar al diagnóstico de carcinoma de ovario, debería ser igualmente aplicable a cualquier tumor que sobreexpresa el antígeno codificado por HE4a. El mismo

ELISA, o una modificación del mismo, también debería ser aplicable para estudios de moléculas relacionadas con HE4, si futuros estudios lo identifican.

5 Expresión de la proteína HE4 en la superficie celular. Los estudios realizados con citometría de flujo, utilizando líneas celulares de carcinoma de ovario con una línea de células B como control negativo, mostraron que el antígeno codificado por HE4a se expresaba en la superficie celular entre algunos carcinomas de ovario. Las líneas celulares usadas y la técnica de citometría de flujo empleada han sido descritas previamente (Hellstrom et al., 2001 Cancer Res. 61, 2420). Por ejemplo, el 93% de las células OVCA3 fueron positivas, al igual que el 71% de las células de la línea 10 4010 de cáncer de ovario y el 38% de las células de la línea de cáncer de ovario HE500V, mientras que menos del 20% de las células fueron positivas de otras 10 líneas de carcinoma de ovario analizadas. Esto sugiere que el antígeno HE4a en la superficie celular puede, de acuerdo con una teoría no limitante, proporcionar un objetivo para estrategias inmunoterapéuticas tales como terapias mediadas por anticuerpos específicos de HE4a y/o mediadas por células T específicas de HE4a.

15 Listado de secuencias

<110> Pacific Northwest Research Institute
Schummer, Michel
Hellstrom, Ingegerd
20 Hellstrom, Karl Erik
Ledbetter, Jeffrey A.
Hayden-Ledbetter, Martha

25 <120> DIAGNÓSTICO DE CARCINOMAS

<130> 730033.412PC

<140> PCT

<141> 2002-08-27

30 <160> 20

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

35 <210> 1

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Cebador de PCR 5' para la región que codifica HE4. Incluido el péptido señal secretor nativo. El sitio HindIII y la secuencia consenso de Kozak secuencia arriba de ATG

<400> 1

45 gttgtaagc ttgccgcat gctgctgt cgcttaggc 39

<210> 2

<211> 36

<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR 3' antisentido para la región que codifica HE4 del codón de PARADA suprimido/sustituido en el marco del sitio de restricción BamHI para clonación

55

<400> 2

gtgttgat ccgaaattgg gagtgacaca ggacac 36

60 <210> 3

<211> 390

<212> ADN

<213> Homo sapiens

65 <400> 3

ES 2 628 952 T3

```

aagcttgccg ccatgcctgc ttgtgccta ggcccgctag ccgcccgcct cctcctcagc      60
ctgctgctgt tcggcttcac cctagtctca ggcacaggag cagagaagac tggcgtgtgc      120
cccagactcc aggetgacca gaactgcacg caagagtgcg tctcggacag cgaatgcgcc      180
gacaacctca agtgetgcag cgcgggctgt gccaccttct gctctctgcc caatgataag      240
gagggttctt gccccaggt gaacattaac tttcccagc tcggcctctg tcgggaccag      300
tgccaggtgg acagccagtg tcttgccag atgaaatgct gccgcaatgg ctgtgggaag      360
gtgtcctgtg tcaactcccaa tttcggatcc

```

<210> 4
 <211> 1077
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

atgcctgctt gtcgcctagg cccgctagcc gcgcctcctc tctcagcct gctgctgttc      60
ggcttcaccc tagtctcagg cacaggagca gagaagactg gcgtgtgccc cgagctccag      120
gctgaccaga actgcaagca agagtgcgtc tcggacagcg aatgcgcccga caacctcaag      180
tgctgcagcg cgggctgtgc caccttctgc tctctgccc atgataagga gggttcctgc      240
ccccaggtga acattaactt tcccagctc ggctctgtc gggaccagtg ccaggtggac      300
agccagtgtc ctggccagat gaaatgctgc cgcaatggct gtgggaaggt gtcctgtgtc      360
actcccaatt tcggatccga gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc      420
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac      480
accctcatga tctcccggac cctgaggtc acatgcgtgg tggggacgt gagccacgaa      540
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca      600
aagccgcggg aggagcagta caacagcagc taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      660
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctcca      720
gcccccatcg agaaaacaat ctccaaagcc aaaggcagc cccgagaacc acaggtgtac      780
accctgcccc catoccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc      840
aaaggcttct atcccagcga catcgcctg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac      900
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag      960
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcat     1020
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga      1077

```

<210> 5
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

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

```

ES 2 628 952 T3

145					150					155					160
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				165					170					175	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			180					185					190		
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
			195				200					205			
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
	210					215					220				
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
225					230					235					240
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
			245					250						255	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn
			260					265					270		
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		275					280					285			
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	290					295					300				
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
305					310					315					320
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
			325					330						335	
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			340					345					350		
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
		355													

- 5 <210> 6
- <211> 1098
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Gen de fusión sintético de humano-ratón

<400> 6

aagcttgccg	ccatgcctgc	ttgtgccta	ggcccgctag	ccgcgcct	cctcctcagc	60
ctgctgctgt	tcggcttcac	cctagtctca	ggcacaggag	cagagaagac	tggcgtgtgc	120
cccagactcc	aggctgacca	gaactgcacg	caagagtgcg	tctcggacag	cgaatgcgcc	180
gacaacctca	agtgtgtcag	cgcgggctgt	gccaccttct	gctctctgcc	caatgataag	240
gagggttcct	gccccaggt	gaacattaac	tttccccagc	tcggcctctg	tcgggaccag	300
tgccaggtgg	acagccagtg	tcctggccag	atgaaatgct	gccgcaatgg	ctgtgggaag	360
gtgtcctgtg	tcactcccaa	tttcggatcc	gagcccagag	ggcccacaat	caagccctgt	420
cctccatgca	aatgcccagc	accgaattca	gctggtacct	catccgtctt	catcttcctt	480
ccaaagatca	aggatgtact	catgatctcc	ctgagcccca	tagtcacatg	tgtgggtggg	540
gatgtgagcg	aggatgaccc	agatgtccag	atcagctggg	ttgtgaacaa	cgtggaagta	600
cacacagctc	agacacaaac	ccatagagag	gattacaaca	gtactctccg	ggtggtcagt	660
gccctcccca	tccagcacca	ggactggatg	agtggcaagg	agttcaaagt	caaggtcaac	720
aacaaagacc	tcccagcgcc	catcgagaga	accatctcaa	aacccaaagg	gtcagtaaga	780
gctccacagc	tatatgtctt	gcctccacca	gaagaagaga	tgactaagaa	acaggtcact	840
ctgacctgca	tggctcacaga	cttcatgcct	gaagacattt	acgtggagtg	gaccaacaac	900
gggaaaacag	agctaaacta	caagaacact	gaaccagtcc	tggactctga	tggttcttac	960
ttcatgtaca	gcaagctgag	agtggaaaag	aagaactggg	tggaaagaaa	tagctactcc	1020
tgttcagtg	tccacgaggg	tctgcacaat	caccacacga	ctaagagctt	ctccccgact	1080
ccgggtaaat	gatctaga					1098

ES 2 628 952 T3

<210> 7
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión humana-ratón

<400> 7

10

```

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

<210> 8
 <211> 583
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 8

ES 2 628 952 T3

```

ccccctgcacc cgcgccggca tagcaccatg cctgcttgtc gcctaggccc gctagccgcc      60
gccctcctcc tcagcctgct gctgttcggc ttcaccctag tctcaggcac aggagcagag      120
aagactggcg tgtgccccga gctccaggct gaccagaact gcacgcaaga gtgctgtctcg      180
gacagcgaat gcgcccgaaa cctcaagtgc tgcagcgcgg gctgtgccac cttctgcctt      240
ctctgccccca atgataagga gggttcctgc ccccagggtga acattaactt tccccagctc      300
ggcctctgtc gggaccagtg ccagggtggac acgcagtgtc ctggccagat gaaatgctgc      360
cgcaatggct gtgggaaggt gtccctgtgtc actcccaatt tctgaggctc agccaccacc      420
aggtgagca gtgaggagag aaagtttctg cctggccctg catctggctc cagcccacct      480
gccctcccct ttttcgggac tctgtattcc ctcttggggg gaccacagct tctccctttc      540
ccaaccaata aagtaaccac tttcagcaaa aaaaaaaaaa aaa                          583

```

<210> 9
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 9

```

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

```

10

<210> 10
 <211> 486
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 10

```

tgagagaaag cggccgcacc cgcgccggca tagcaccatg cctgcttgtc gcctaggccc      60
gctagccgcc gccctcctcc tcagcctgct gctgttcggc ttcaccctag tctcaggcac      120
aggagcagag aagactggcg tgtgccccga gctccaggct gaccagaact gcacgcaaga      180
gtgctgtctcg gacagcgaat gcgcccgaaa cctcaagtgc tgcagcgcgg gctgtgccac      240
cttctgctct ctgcccaatg ataaggaggg ttctgcccc cagggtgaaca ttaactttcc      300
ccagctcggc ctctgtcggg accagtgcc ggtggacagc cagtgtcctg gccagatgaa      360
atgctgccgc aatggctgtg ggaaggtgtc ctgtgtcact cccaatttct gagctccggc      420
caccaccagg ctgagcagtg aagatagaaa gtttctgect ggccctgcag cgtgttacag      480
cccacc                                             486

```

20

<210> 11
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 11

ES 2 628 952 T3

```

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

```

5 <210> 12
 <211> 374
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 12

```

ccatgcctgc ttgtgccta ggcccgctag ccgccgcct cctcctcagc ctgctgctgt      60
tcggcttcac cctagtctca ggcacaggag cagagaagac tggcgtgtgc cccgagctcc      120
aggctgacca gaactgcacg caagagtgcg tctcggacag cgaatgcgcc gacaacctca      180
agtgtctgcag cgcgggctgt gccaccttct gctctctgcc caatgataag gagggttctt      240
gcccccaggt gaacattaac tttccccagc tcggcctctg tcgggaccag tgccagggtg      300
acagccagtg tctgtgccag atgaaatgct gccgcaatgg ctgtgggaag gtgtcctgtg      360
tcactcccaa tttc                                     374

```

15 <210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 13

```

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

```

ES 2 628 952 T3

<210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 14
Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile
1 5 10 15
Asp Glu Ser
10 <210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> Cebador de PCR en tiempo real de HE4 directo
<400> 15
agcagagaag actggcgtgt 20
20 <210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> Cebador de PCR en tiempo real de HE4 inverso
<400> 16
30 gaaagggaga agctgtggtc a 21
<210> 17
<211> 20
<212> ADN
35 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador directo
40 <400> 17
cgacgcttct tcaaggccaa 20
<210> 18
<211> 20
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador inverso
50 <400> 18
atggaagccc aagctgctga 20
<210> 19
<211> 36
<212> ADN
55 <213> Secuencia Artificial
<220>
60 <223> Cebador sentido directo
<400> 19

ES 2 628 952 T3

gtgtcggat ccgagcccag agggcccaca atcaag 36

<210> 20

<211> 43

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador antisentido inverso

10

<400> 20

gtgtttcta gattatcatt taccggagt ccgggagaag ctc 43

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma de ovario en un sujeto que comprende:
 - 5 poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con al menos un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico que consiste de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 para determinar la presencia en dicha muestra biológica de una molécula de origen natural en forma soluble en dicha muestra y que tiene un determinante antigénico que es reactivo con dicho al menos un anticuerpo, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para detectar la unión de dicho anticuerpo a dicho determinante antigénico,
 - 10 y a partir de allí detectar la presencia de carcinoma de ovario caracterizado porque la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en: una muestra de sangre; una muestra de suero; y una muestra de plasma.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal murino.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la detección de la unión del anticuerpo a un determinante antigénico comprende la detección espectrofotométrica de un producto de una reacción enzimática.
- 20 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la detección de la unión del anticuerpo al determinante antigénico se consigue mediante un ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA).
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene una etapa temprana del carcinoma de ovario.
- 25 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además determinar en una muestra biológica de dicho sujeto CA-125, seleccionándose dicha muestra del grupo que consiste en: una muestra de sangre, una muestra de suero y una muestra de plasma.

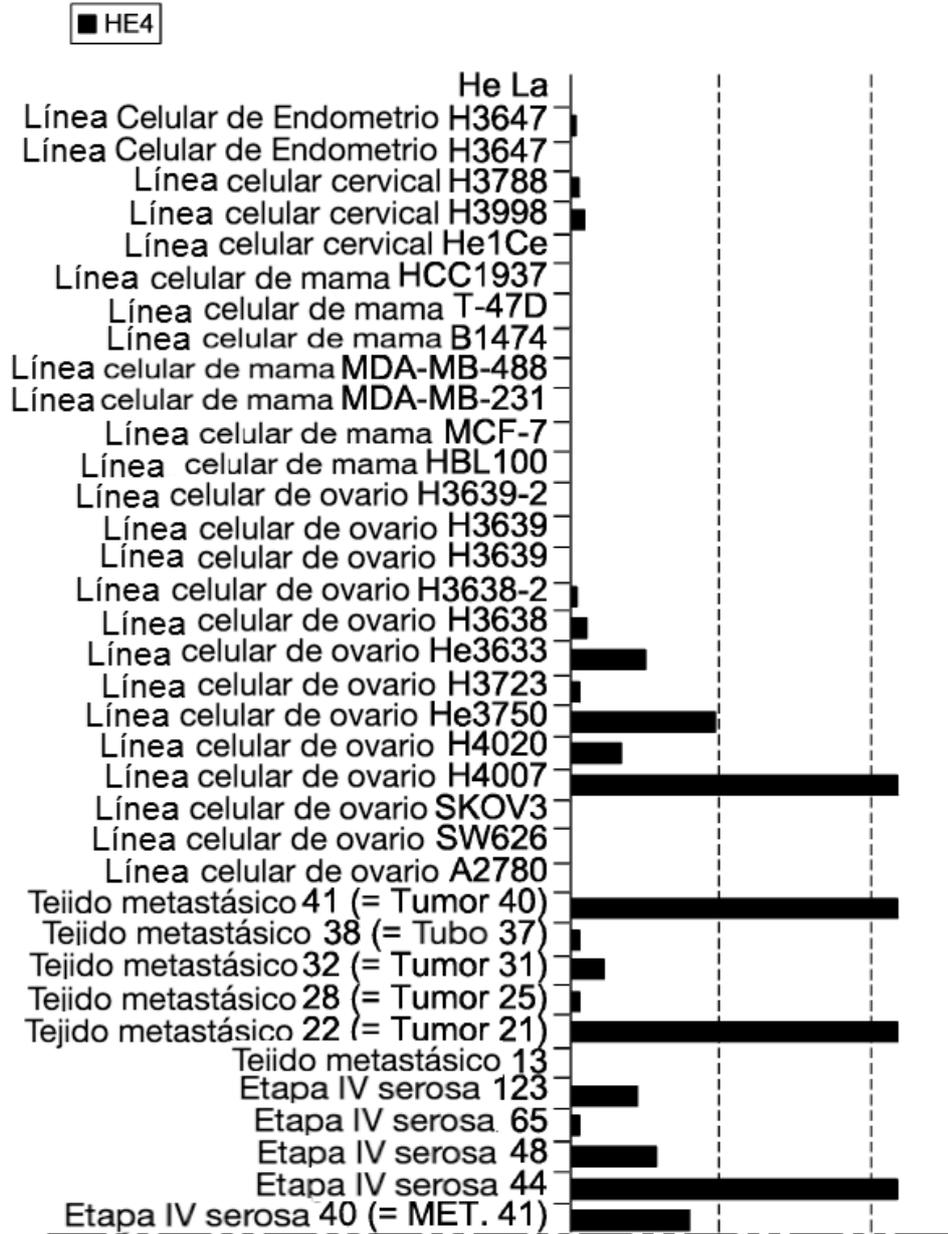


FIG. 1A-1

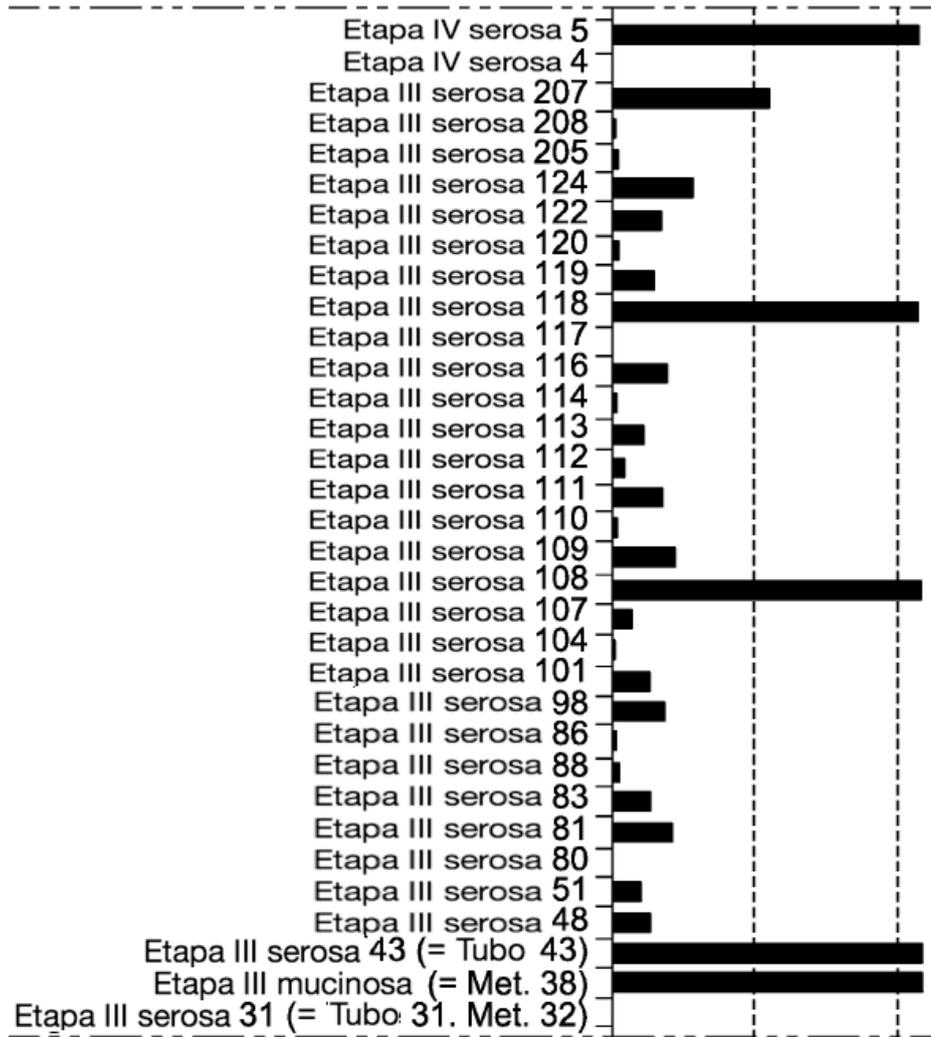


FIG. 1A-2

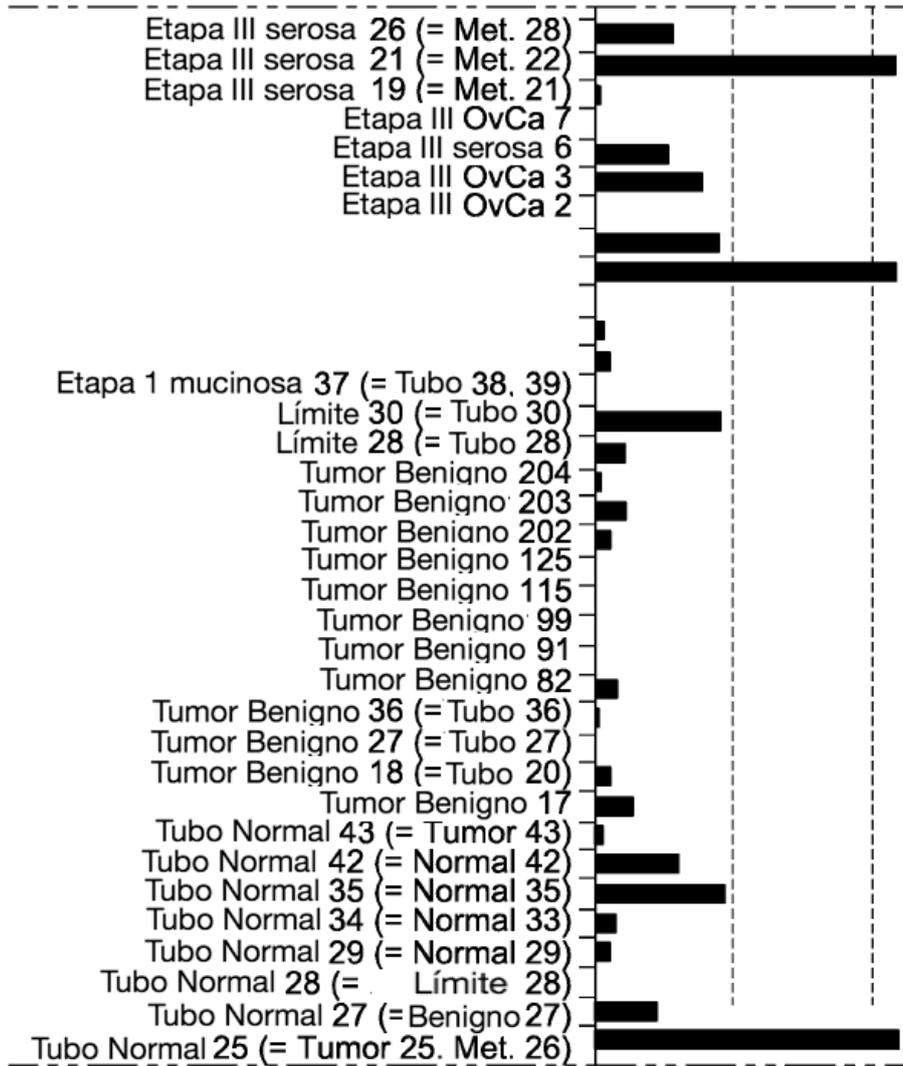


FIG. 1A-3

Pared Intestinal Normal 21 (= Tumor 19)			
Tubo Normal 20 (= Benigno 18)			
Ovario Normal 121			
Ovario Normal 106			
Ovario Normal 105			
Ovario Normal 103			
Ovario Normal 100			
Ovario Normal 97			
Ovario Normal 96			
Ovario Normal 95			
Ovario Normal 94			
Ovario Normal 92			
Ovario Normal 90			
Ovario Normal 89			
Ovario Normal 88			
Ovario Normal 87			
Ovario Normal 85			
Ovario Normal 84			
Ovario Normal 83			
Ovario Normal 82			
Ovario Normal 81			
Ovario Normal 64			
Ovario Normal 58			
Ovario Normal 57			
Ovario Normal 56			
Ovario Normal 54			
Ovario Normal 53			
Ovario Normal 52			
Ovario Normal 50			
Ovario Normal 49			
Ovario Normal 47			
Ovario Normal 45			
Ovario Normal 41 (= Tubo 42)			
Ovario Normal 39 (= Tubo 39)			
Ovario Normal 33 (= Tubo 33)			
Ovario Normal 29 (= Tubo 29)			
Ovario Normal 22 (= Tubo 23)			

FIG. 1B-1

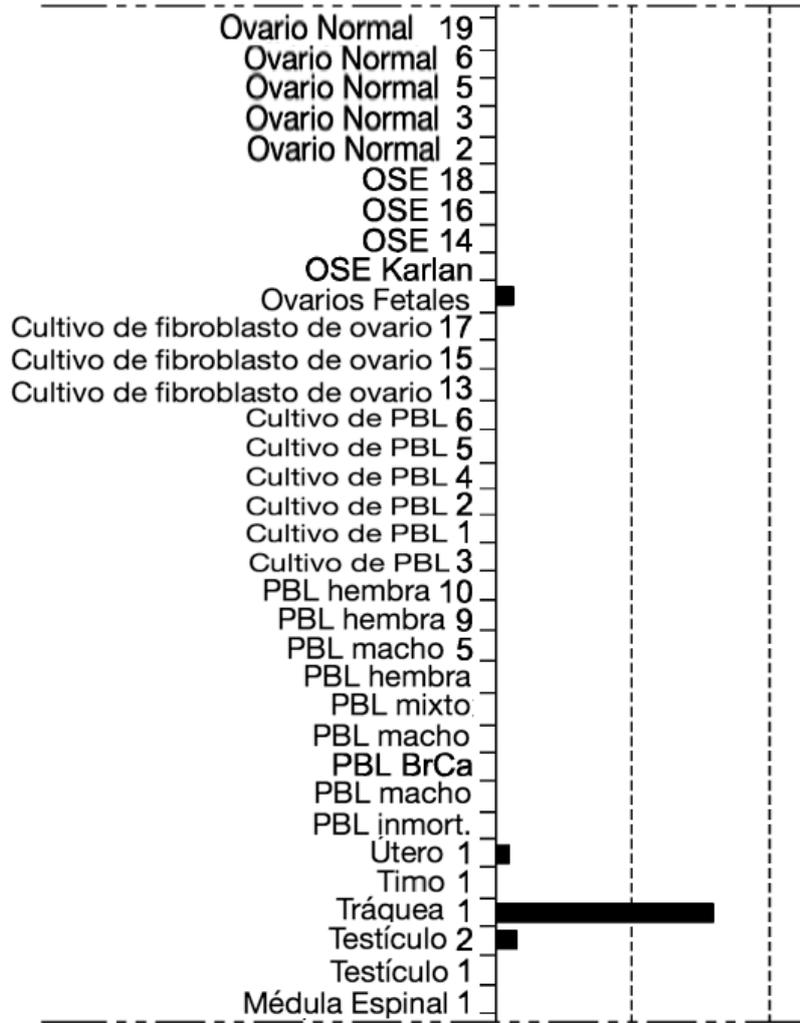


FIG. 1B-2

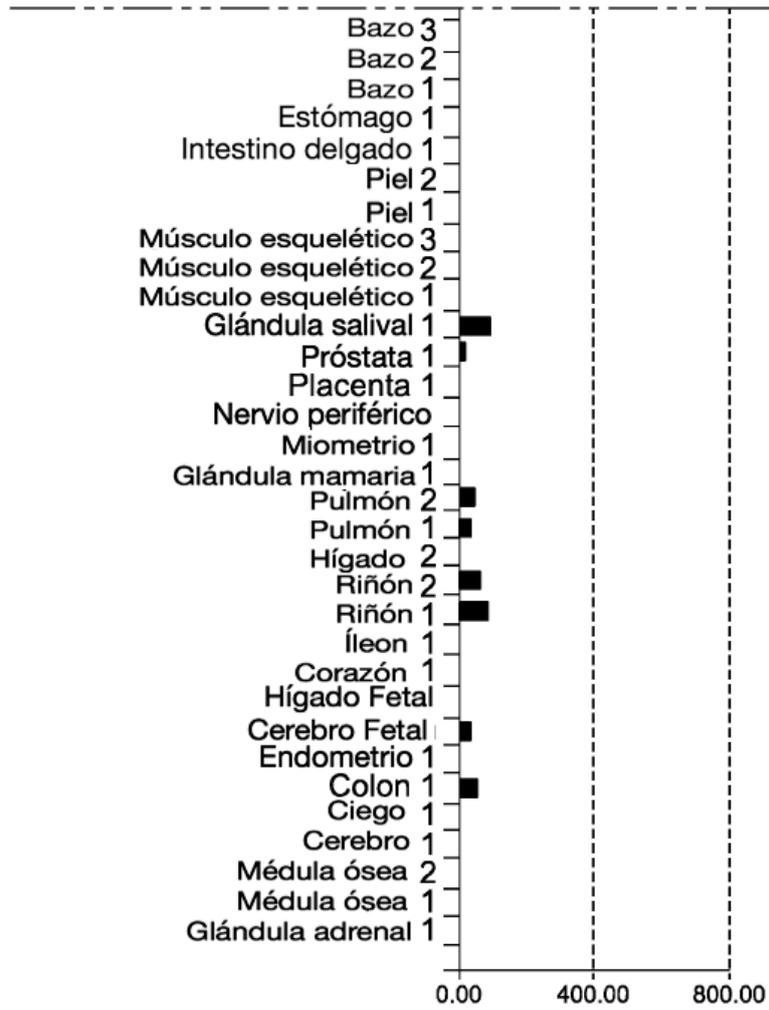


FIG. 1B-3

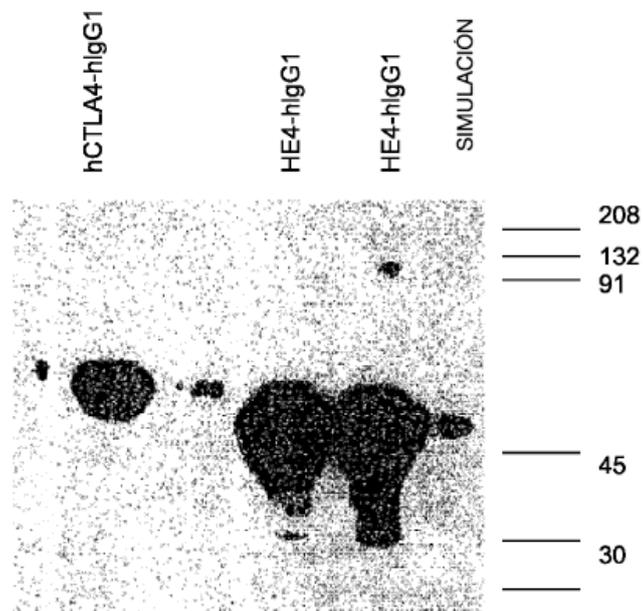


FIG. 2

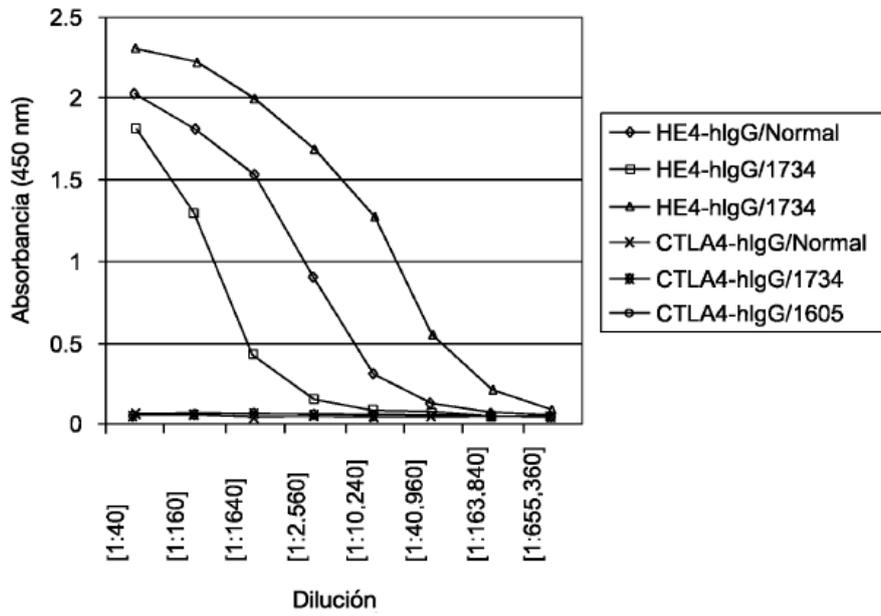


FIG. 3

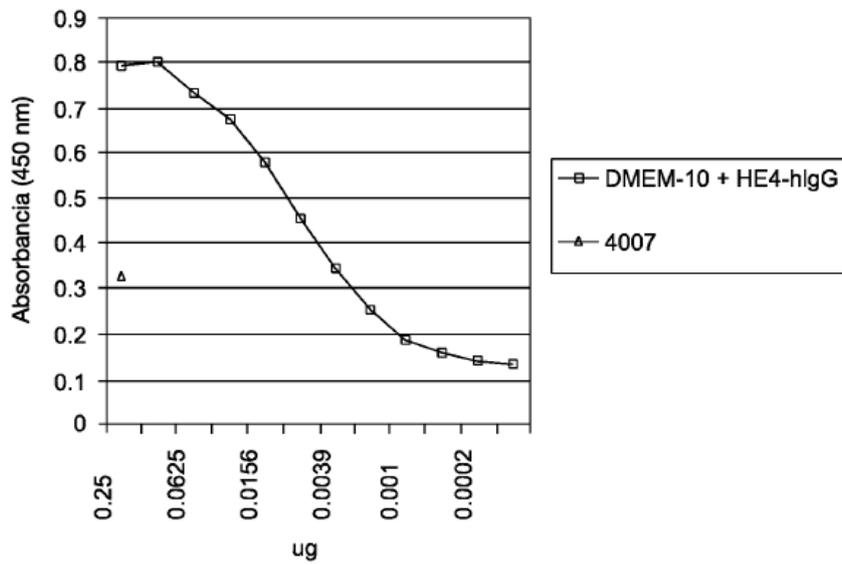


FIG. 5

Placa 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,181	0,130	0,192	0,140	0,159	0,135	0,130	0,164	0,139	0,108	0,142	0,138
B	0,160	0,129	0,133	0,144	0,144	0,121	0,136	0,130	0,131	0,120	0,138	0,150
C	0,147	0,146	0,130	0,158	0,135	0,142	0,139	0,121	0,130	0,113	0,118	0,146
D	0,200	0,141	0,145	0,158	0,149	0,114	0,165	0,148	0,129	0,140	0,130	0,167
E	0,175	0,130	0,143	0,111	0,132	0,129	0,140	0,143	0,126	0,134	0,139	0,172
F	0,154	0,122	0,133	0,133	0,135	0,144	0,161	0,132	0,117	0,121	0,118	0,182
G	0,180	0,166	0,147	0,143	0,133	0,126	0,167	0,125	0,149	0,142	0,138	0,156
H	0,178	0,152	0,160	0,149	0,163	0,142	0,166	0,168	0,144	0,125	0,140	0,166

Placa 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,173	0,141	0,156	0,152	0,111	0,145	0,159	0,250	0,111	0,119	0,129	0,146
B	0,158	0,129	0,128	0,124	0,135	0,108	0,112	0,154	0,138	0,101	0,103	0,135
C	0,096	0,160	0,125	0,104	0,102	0,165	0,105	0,135	0,123	0,096	0,097	0,107
D	0,099	0,101	0,115	0,121	0,104	0,101	0,123	0,123	0,117	0,127	0,115	0,137
E	0,108	0,130	0,143	0,101	0,113	0,118	0,140	0,107	0,097	0,136	0,102	0,131
F	0,086	0,118	0,137	0,116	0,113	0,128	0,101	0,111	0,120	0,113	0,087	0,129
G	0,108	0,094	0,127	0,130	0,147	0,132	0,118	0,114	0,123	0,114	0,110	0,119
* H	0,108	0,121	0,133	0,130	1,087	0,139	0,107	0,116	0,124	0,106	0,138	0,143

2H5

Placa 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,152	0,166	0,126	0,153	0,128	0,122	0,138	0,116	0,140	0,092	0,119	0,172
B	0,153	0,110	0,103	0,132	0,115	0,103	0,185	0,102	0,142	0,101	0,098	0,108
C	0,135	0,113	0,108	0,118	0,105	0,156	0,129	0,090	0,106	0,120	0,105	0,122
* D	0,133	0,121	0,137	0,112	0,126	0,130	0,148	1,044	0,116	0,133	0,127	0,130
E	0,117	0,123	0,137	0,132	0,132	0,096	0,119	0,132	0,102	0,112	0,098	0,105
F	0,118	0,125	0,121	0,128	0,133	0,114	0,109	0,111	0,113	0,084	0,108	0,143
G	0,147	0,139	0,131	0,121	0,108	0,097	0,137	0,118	0,106	0,132	0,101	0,110
H	0,155	0,116	0,193	0,105	0,144	0,128	0,125	0,102	0,149	0,129	0,128	0,116

3D8.

FIG.4-1

Placa 4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,128	0,121	0,110	0,134	0,126	0,157	0,120	0,134	0,137	0,098	0,064	0,120
B	0,153	0,126	0,114	0,116	0,156	0,172	0,117	0,133	0,137	0,086	0,131	0,142
C	0,115	0,150	0,111	0,121	0,106	0,102	0,115	0,114	0,118	0,090	0,104	0,135
D	0,114	0,130	0,124	0,092	0,087	0,109	0,133	0,099	0,112	0,122	0,117	0,132
E	0,114	0,124	0,110	0,127	0,093	0,108	0,108	0,104	0,107	0,111	0,134	0,155
F	0,122	0,127	0,117	0,122	0,145	0,129	0,121	0,109	0,104	0,152	0,105	0,143
G	0,121	0,118	0,127	0,127	0,119	0,124	0,104	0,120	0,121	0,109	0,133	0,119
* H	0,133	0,134	0,152	0,054	0,127	0,110	0,133	0,112	0,126	0,092	0,127	0,099

4H4

Placa 5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,101	0,109	0,144	0,005	0,031	0,039	0,037	0,047	0,043	0,038	0,042	0,048
B	0,111	0,129	0,109	0,997	0,025	0,032	0,043	0,038	0,037	0,039	0,040	0,042
C	0,119	0,121	0,093	0,979	0,024	0,040	0,038	0,037	0,042	0,040	0,052	0,046
D	0,116	0,102	0,125	0,035	0,027	0,035	0,040	0,038	0,042	0,038	0,040	0,044
E	0,120	0,092	0,101	0,986	0,027	0,032	0,036	0,035	0,041	0,037	0,038	0,038
F	0,105	0,116	0,110	0,748	0,025	0,037	0,044	0,036	0,035	0,037	0,044	0,050
G	0,122	0,108	0,114	0,961	0,022	0,040	0,041	0,041	0,041	0,037	0,043	0,049
H	0,135	0,101	0,167	0,037	0,030	0,032	0,031	0,036	0,036	0,041	0,041	0,061

FIG.4-2

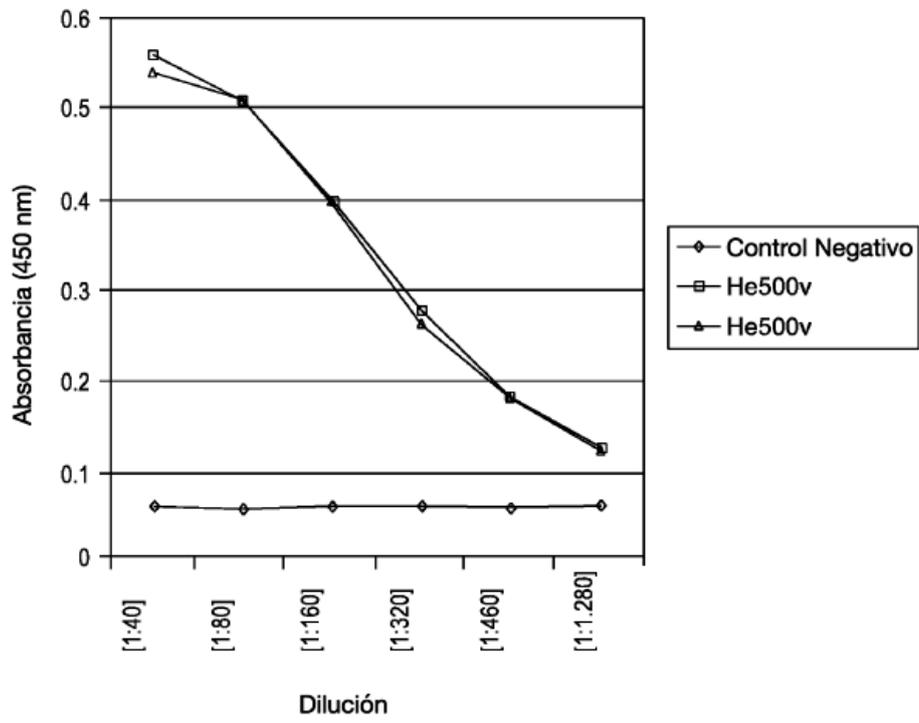


FIG. 6