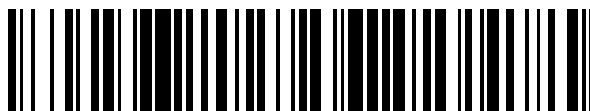


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 525**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2003 E 15155786 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2891666**

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

30 Prioridad:

16.10.2002 US 418828 P

10.07.2003 US 485986 P

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

10.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 641 525 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).

Anticuerpos que se unen a CA 125/O772P asociado a células y métodos de uso de los mismos

Descripción

5 1. CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, que se unen de manera preferente a polipéptidos CA 125/O772P asociados a células, con respecto a polipéptidos CA 125/O772P desprendidos y composiciones farmacéuticas de los mismos. La presente divulgación proporciona además métodos para prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno relacionado con los CA 125/O772P. En particular, la presente divulgación proporciona métodos para prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno proliferativo celular. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona métodos para prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados al cáncer. En una realización preferida, la presente divulgación proporciona métodos para prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas del cáncer de ovario. La presente invención proporciona también composiciones para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular como un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, y la presente divulgación proporciona artículos de fabricación para su uso con el fin de prevenir, manejar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno relacionado con los CA 125/O772P, por ejemplo, cáncer, incluido cáncer de ovario. La presente divulgación proporciona adicionalmente métodos para diagnosticar un trastorno relacionado con los CA 125/O772P o la predisposición a desarrollar un trastorno de este tipo.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

Además de anticuerpos para monitorizar la presencia de CA 125, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.858.361 y 6.241.985 describen anticuerpos anti-CA 125 anti-idiotipo como agentes terapéuticos.

Composiciones que comprenden anticuerpos para terapia y diagnóstico del cáncer, en particular cáncer de ovario, se divulgan en los documentos WO 00/36107 y WO0206317. Nustad et al., Tumor Biol. 17:196:219 (1996), identifican dos dominios antigénicos principales en CA 125 y, sobre esta base, clasifican 26 anticuerpos monoclonales que se sometieron a ensayo en cuanto a especificidad y afinidad en tres grupos: de tipo C125, de tipo M11 y un único anticuerpo OV 197. Nap et al., Tumor Biol. 17:325-331 (1996), tratan la caracterización inmunohistoquímica de 22 anticuerpos monoclonales contra el antígeno CA125.

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

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

3. RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida al anticuerpo aislado como se reivindica en la reivindicación 1, a la composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 7, y al anticuerpo aislado para su uso como se reivindica en las reivindicaciones 8 y 9. La presente invención se basa, en parte, en el reconocimiento de que los acontecimientos que producen CA 125/O772P desprendidos dejan también una parte de la región extracelular de la secuencia de aminoácidos de los CA 125/O772P en una forma asociada a células, es decir, producen también CA 125/O772P asociados a células.

La presente invención se basa además, en parte, en el reconocimiento de que se pueden generar anticuerpos, y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociados a células, con respecto a CA 125/O772P desprendidos, y de que dichos anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, se pueden utilizar, por ejemplo, para prevenir, manejar, tratar o mejorar un trastorno relacionado con los CA 125/O772P o uno o más síntomas de un trastorno relacionado con los CA 125/O772P, tal como un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, incluido cáncer de ovario.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une de manera preferente a un polipéptido CA 125/O772P asociado a células, con respecto a polipéptidos CA 125/O772P desprendidos, como se define en las reivindicaciones. Se proporciona también un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, aislado, que se une al péptido de la Figura 1. Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención son útiles para una variedad de fines terapéuticos, profilácticos, diagnósticos y de purificación, según se describe en el presente documento.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención es aquel que se une al péptido de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, y se une de manera preferente a CA 125/O772P, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención se une a la región no repetitiva representada en la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2. En otra realización de la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la divulgación se une a una región repetitiva representada en la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.

En una primera realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención presenta, en un Ensayo de Competición ELISA, menos de aproximadamente un 25 %, menos de aproximadamente un 20 %, menos de aproximadamente un 15 %, menos de aproximadamente un 10 % o menos de aproximadamente un 5 % de inhibición de la unión al péptido de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/O772P desprendido con respecto al péptido de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) y/o, en una segunda realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención presenta, en un Ensayo de Competición por Citometría de Flujo, una CI_{50} , medida por porcentaje de células positivas, de al menos aproximadamente 0,05 mg/ml, al menos aproximadamente 0,25 mg/ml, al menos aproximadamente 0,5 mg/ml, al menos aproximadamente 0,75 mg/ml o al menos aproximadamente 1,0 mg/ml de CA 125/O772P desprendido. En una tercera realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la divulgación se une al péptido de la Figura 1, pero no se une de manera detectable al polipéptido CA 125/O772P desprendido.

Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que satisfaga cualquiera de estas tres realizaciones constituye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que "se une de manera preferente" a un polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido.

Entre los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención se encuentran anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen al péptido de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) con una K_d menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 1 nM, menor de aproximadamente 100 pM o menor de aproximadamente 10 pM según se mide por medio del Ensayo de Afinidad BIAcore, que se describe en la Sección 6.4 del presente documento.

Entre las realizaciones preferidas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la divulgación se encuentran anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que median la lisis de células tumorales positivas para CA 125/O772P en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos incluyen, por ejemplo, aquellos que median al menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 50: 1 y a una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median al menos aproximadamente un 20 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 50: 1 y con una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median al menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación efector:diana 50:1 y con una concentración de 5,0 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median al menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 25:1 y con una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos por ml; que median al menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 12,5:1 y con una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos por ml; que median al menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de

ADCC con una relación de efector:diana 12,5:1 y con una concentración de 0,5 µg de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos por ml; o que median al menos aproximadamente un 10 % de lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 12,5: 1 y con una concentración de 50 ng de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos por ml.

5

Las realizaciones preferidas de la descripción incluyen también anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que median la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos incluyen, por ejemplo, aquellos que median la lisis en un intervalo de aproximadamente un 15 % de lisis a 5 µg/ml y aproximadamente un 95 % de lisis a una concentración de aproximadamente 0,1 µg/ml de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

Las realizaciones preferidas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención incluyen también anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que inhiben el crecimiento tumoral positivo para el CA 125/O772P.

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

30

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la divulgación es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que compite con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (Acceso ATCC® N.º PTA-51 09), o por el hibridoma 7A11 (Acceso ATCC® N.º PTA-5110), o por el hibridoma 7C6 (Acceso ATCC® N.º PTA-5111), o por el hibridoma 7F10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5112), o por el hibridoma 7G10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5245), o por el hibridoma 7H1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5114), o por el hibridoma 8A1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5115), o por el hibridoma 8B5 (Acceso ATCC® N.º PTA-5116), o por el hibridoma 8C3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5246), o por el hibridoma 8E3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5118), o por el hibridoma 8G9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5119), o por el hibridoma 15C9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5106), o por el hibridoma 16C7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5107), o por el hibridoma 16H9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5108), o por el hibridoma 117.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4567), o por el hibridoma 325.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5120), o por el hibridoma 368.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4568), o por el hibridoma 446.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5549), o por el hibridoma 501.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4569), o por el hibridoma 621.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5121), o por el hibridoma 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), o por el hibridoma 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), o por el hibridoma 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5124), o por el hibridoma 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570) para unirse a CA 125/O772P asociado a células. Se considera que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención compiten por unirse si compiten por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA y/o un Ensayo de Competición Cruzada FACS. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compite por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA o un Ensayo de Competición Cruzada FACS si la CI_{50} para el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos. En una realización preferida, la CI_{50} del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 10 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de unión a antígenos. En una realización de mayor preferencia, la CI_{50} del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que un valor aproximadamente equimolar respecto de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera 117.1 ("117.1L") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:27 (117.1L). En otra realización particular más, un anticuerpo o fragmento de unión a

60

antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena pesada 117.1 ("117.1H") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:28 (117.1H). En incluso otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:27 (117.1L) y una región variable polipeptídica de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:28 (117.1H).

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera 368.1 ("368.1L") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:29 (368.1L). En otra realización particular más, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable de cadena pesada 368.1 ("368.1H") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:30 (368.1H). En incluso otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos descrito es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:29 (368.1L) y una región variable polipeptídica de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:30 (368.1H).

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera 501.1 ("501.1L") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:31 (501.1L). En otra realización particular más, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable de cadena pesada 501.1 ("501.1H") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:32 (501.1H). En incluso otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:31 (501.1L) y una región variable polipeptídica de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:32 (501.1H).

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera 776.1 ("776.1L") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:33 (776.1L). En otra realización particular más, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable de cadena pesada 776.1 ("776.1H") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:34 (776.1H). En incluso otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:33 (776.1L) y una región variable polipeptídica de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:34 (776.1H).

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera 725.1 ("725.1L") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:54. En otra realización particular más, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos descrito es aquel que comprende una región variable de cadena pesada 725.1 ("725.1H") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:53. En incluso otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos descrito es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:54 y una región variable polipeptídica de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:53.

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera 16H9 ("16H9L") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:56. En otra realización particular más, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de la invención es aquel que comprende una región variable de cadena pesada 501.1 ("16H9") que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:55. En incluso otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:56 y una región variable polipeptídica de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:55.

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:27 (117.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H), o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:29 (368.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H), o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:31 (501.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H), o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:33 (776.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H), o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:54 (725.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H), o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:33 (16H9L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H), o SEQ ID NO:55 (16H9H).

Los anticuerpos pueden incluir, a título ilustrativo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos trispecíficos, anticuerpos multispecíficos, diacuerpos, tricuerpos, anticuerpos de cadena sencilla o anticuerpos anti-idiotipo. En una realización preferida, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células, con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido.

Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos pueden incluir, entre otros, fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$, F_{VS} con enlace de sulfuro, F_{VS} de cadena sencilla, fragmentos que contengan polipéptido de cadena ligera variable (VL), fragmentos que contengan polipéptido de cadena pesada variable (VH), o fragmentos que contengan una región determinante de complementariedad (CDR), y fragmentos de cualquiera de los anticuerpos enumerados anteriormente. Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos de clase IgG, IgM, IgE, IgD, IgA o IgY. Los anticuerpos de la invención pueden ser también de cualquier isotipo. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser de un isotipo de cadena pesada IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ o IgA₂.

Asimismo, los anticuerpos pueden comprender, por ejemplo, una región de cadena ligera variable, por ejemplo, una región variable de cadena ligera κ o λ , una región de cadena pesada variable, o una CDR de las mismas, insertada dentro de una región estructurada. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede comprender una región constante Cy1 o una región constante Cy4.

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

(Acceso ATCC® N.º PTA- 5121), hibridoma 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), hibridoma 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), hibridoma 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5124), o hibridoma 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570).

En otra realización, un hibridoma de la presente divulgación es un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales que compiten con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5109), hibridoma 7A11 (Acceso ATCC® N.º PTA-5110), hibridoma 7C6 (Acceso ATCC® N.º PTA-5111), hibridoma 7F10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5112), hibridoma 7G10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5245), hibridoma 7H1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5114), hibridoma 8A1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5115), hibridoma 8B5 (Acceso ATCC® N.º PTA-5116), hibridoma 8C3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5246), hibridoma 8E3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5118), hibridoma 8G9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5119), hibridoma 15C9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5106), hibridoma 16C7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5107), hibridoma 16H9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5108), hibridoma 117.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4567), hibridoma 325.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5120), hibridoma 368.1 (Acceso ATCC® N.º PTA- 4568), hibridoma 446.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5549), hibridoma 501.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4569), hibridoma 621.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5121), hibridoma 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), hibridoma 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), hibridoma 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5124), o hibridoma 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570) para unirse al CA 125/O772P asociado a células. Se considera que los anticuerpos compiten por unirse si compiten por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA y/o un Ensayo de Competición Cruzada FACS. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compite por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA o un Ensayo de Competición Cruzada FACS si la CI_{50} para el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos. En una realización preferida, la CI_{50} del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 10 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de unión a antígenos. En una realización de mayor preferencia, la CI_{50} del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor no es mayor que un valor aproximadamente equimolar respecto de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión antígenos de la invención. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos divulgado, es decir, uno que se une de manera preferente a polipéptido CA 125/O772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/O772P desprendido, unido operativamente a un agente heterólogo. En una realización de un polipéptido de fusión, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, y el agente heterólogo están unidos operativamente a través de una unión covalente, tal como un enlace peptídico o enlace disulfuro. En otra realización, un polipéptido de fusión, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, y el agente heterólogo pueden estar unidos operativamente a través de una unión no covalente. En otra realización de un polipéptido de fusión divulgado, el agente heterólogo comprende una secuencia de aminoácidos o un radioisótopo. En diversas realizaciones no limitativas, el agente heterólogo del polipéptido de fusión de la invención comprende un agente citotóxico o un agente detectable, por ejemplo, formador de imágenes.

Se divulgan también análogos de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptidos de fusión de la invención que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, con respecto a CA 125/O772P desprendido, según se define en las reivindicaciones. En una realización, un análogo de este tipo presenta una afinidad aumentada para el CA 125/O772P asociado a células, con respecto a la de un anticuerpo, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptido de fusión premodificados correspondientes. En otra realización, un análogo de este tipo presenta una semividua sérica aumentada en comparación con un anticuerpo, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptido de fusión premodificados correspondientes. Por ejemplo, entre los análogos de la invención se encuentran análogos del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5109), o por el hibridoma 7A11 (Acceso ATCC® N.º PTA-5110), o por el hibridoma 7C6 (Acceso ATCC® N.º PTA-5111), o por el hibridoma 7F10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5112), o por el hibridoma 7G10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5245), o por el hibridoma 7H1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5114), o por el hibridoma 8A1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5115), o por el hibridoma 8B5 (Acceso ATCC® N.º PTA-5116), o por el hibridoma 8C3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5246), o por el hibridoma 8E3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5118), o por el hibridoma 8G9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5119), o por el hibridoma 15C9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5106), o por el hibridoma 16C7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5107), o por el hibridoma 16H9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5108), o por el hibridoma 117.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4567), o por el hibridoma 325.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5120), o por el hibridoma 368.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4568), o por el hibridoma 446.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5549), o por el hibridoma 501.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4569), o por el hibridoma 621.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5121), o por el hibridoma 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), o por el hibridoma 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), o por el

hibridoma 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5124), o por el hibridoma 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, un polipéptido de fusión, o un análogo de la invención, es decir, uno que se une de manera preferente a polipéptido CA 125/O772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/O772P desprendido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se proporciona también un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, se proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica de la invención contenida dentro del material de envasado, dicha composición farmacéutica se encuentra en una forma adecuada para su administración a un sujeto, preferentemente un ser humano. En una realización, el artículo de fabricación comprende además instrucciones impresas y/o una etiqueta referentes al uso o administración de la composición farmacéutica. Las instrucciones y/o etiqueta pueden, por ejemplo, sugerir un régimen de dosificación para evitar o tratar uno o más síntomas de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, tal como un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, incluido cáncer de ovario, de útero, de mama o de pulmón.

Se divulgan también métodos para prevenir, tratar, manejar o mejorar un síntoma de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, que comprenden: administrar a un sujeto que necesite dicha prevención, tratamiento, manejo o mejora, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo en una cantidad suficiente para prevenir, tratar, manejar o mejorar un síntoma del trastorno proliferativo celular, donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, con respecto a CA 125/O772P desprendido.

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

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

En otra realización más, los métodos se llevan a la práctica como parte de una terapia combinada contra el cáncer. Dicha terapia combinada contra el cáncer puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente quimioterapéutico, como paclitaxel o cisplatino. Dicha terapia combinada contra el cáncer puede incluir como alternativa, a título ilustrativo, radioterapia.

Se proporciona también un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, con respecto a CA 125/O772P desprendido. En una realización, un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células comprende hacer entrar en contacto un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos con un péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células (por ejemplo, un polipéptido CA 125/O772P asociado a células o incluso el polipéptido CA 125/O772P de longitud completa) en presencia de CA 125/O772P desprendido (preferentemente una cantidad en exceso (peso/peso) de desprendimiento) en condiciones que permitan la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o bien a dicho péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células o bien a dicho CA 125/O772P desprendido. Después de la incubación, se retiran el CA 125/O772P desprendido (con o sin anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos unido) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos no unido, y se mide la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos unido al péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de dicho método satisface cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con "se une de manera preferente a", entonces dicho anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, es uno que se une de manera preferente a polipéptido CA 125/O772P asociado a células, con

respecto a polipéptido CA 125/O772P desprendido. En una realización preferida, la relación de CA 125/O772P desprendido con respecto a CA 125/O772P asociado a células en la mezcla de la reacción es aproximadamente 25:1 (p/p). Como parte de este método, el CA 125/O772P asociado a células se puede inmovilizar en una superficie sólida. Por ejemplo, el método se puede realizar en un formato ELISA.

5

En incluso otra realización, la divulgación proporciona un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, con respecto a CA 125/O772P desprendido, que comprende hacer entrar en contacto el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con un péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células y CA 125/O772P desprendido (preferentemente una cantidad en exceso (peso/peso) de desprendimiento), por ejemplo, una cantidad en exceso de, aproximadamente, 25 veces (p/p), en condiciones que permiten la unión del péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, retirar el péptido no unido que comprende CA 125/O772P asociado a células, medir la cantidad de péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células al que se ha unido el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, y comparar la cantidad medida con la cantidad de péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se puede unir en ausencia de dicha cantidad de CA 125/O772P desprendido (es decir, una cantidad menor). Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de dicho método satisface una cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con "se une de manera preferente a", entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido. Como parte de este método, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, se puede inmovilizar en una superficie sólida, por ejemplo, el método se puede realizar en un formato ELISA.

En otra realización más, la divulgación proporciona un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, que comprende hacer entrar en contacto el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con una célula que expresa CA 125/O772P y con una cantidad, por ejemplo, al menos aproximadamente de 0,05 mg/ml, de CA 125/O772P desprendido (preferentemente un exceso de cantidad (p/p) de desprendimiento) en condiciones que permiten la unión del CA 125/O772P al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, retirar células no unidas, medir la cantidad de células que expresan CA 125/O772P a las que se ha unido el anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, y comparar la cantidad medida con la cantidad de células que expresan CA 125/O772P que se une al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en ausencia de dicha cantidad (es decir, una cantidad menor) de CA 125/O772P desprendido. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de dicho método satisface cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con "se une de manera preferente a", entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une de manera preferente a polipéptido CA 125/O772P asociado a células, con respecto a polipéptido CA 125/O772P desprendido. Dicho método se puede realizar, por ejemplo, cuando la medición se realice por técnicas de citometría de flujo, incluyendo, por ejemplo, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se divulgan también métodos para diagnosticar un trastorno relacionado con el CA 125/O772P o la predisposición a un trastorno relacionado con el CA 125/O772P.

3.1. Terminología

Como se usa en el presente documento, el término "análogo" en el contexto de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión de la invención se refiere a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión que está modificado con respecto a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión correspondiente de la invención (al que se hace referencia en este contexto como anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión "premodificado" de la invención) antes de la modificación presente en el análogo, pero que todavía se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células con respecto a CA 125/O772P desprendido según se reivindica.

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

55

La expresión "anticuerpo de la invención", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido, según se reivindica. De modo similar, la expresión "fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención", como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células, con respecto al

60

polipéptido CA 125/O772P desprendido, como se define en las reivindicaciones. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se considera un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de la invención incluso si se une a un polipéptido CA 125/O772P, es decir, un polipéptido CA 125/O772P predesprendido, siempre que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se una igualmente de manera preferente a un CA 125/O772P asociado a células con respecto al CA 125/O772P desprendido, como se define en las reivindicaciones. Como se describe posteriormente, debido al hecho de que el CA 125/O772P asociado a células, antes del desprendimiento del CA 125/O772P, está presente como parte de CA 125/O772P predesprendido, se observa que los anticuerpos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células también se pueden unir a CA 125/O772P predesprendido. De este modo, con independencia de si un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une o no al CA 125/O772P, el mismo se considera un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención siempre que satisfaga los criterios expuestos en el presente documento en relación con "se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P con respecto al CA 125/O772P desprendido". Se observa además que, a no ser que se indique lo contrario, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan de manera intercambiable.

La expresión "Ensayo de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos" (ensayo de ADCC), como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo de ADCC descrito a continuación en la Sección 6.5. Como tal, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que media la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC es aquel que se considera positivo cuando se somete a prueba en el ensayo de ADCC descrito a continuación en la Sección 6.5.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une a" en el contexto de la unión anticuerpo-antígeno, por ejemplo, en el contexto de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células, se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen específicamente a un antígeno particular (por ejemplo, el CA 125/O772P asociado a células) y no se unen específicamente a otros antígenos. Preferentemente, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es aquel que se une al CA 125/O772P con una especificidad de al menos 5 DO/microgramo de anticuerpo según se determina mediante un Ensayo de Especificidad ELISA, o que se considera positivo en un Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo. Un péptido o polipéptido que se une a un antígeno se puede unir a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos, análisis BIAcore, Scatchard u otros ensayos conocidos en la técnica. Los anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a un antígeno pueden presentar reactividad cruzada con antígenos relacionados. Preferentemente, los anticuerpos o fragmentos que se unen a un antígeno no presentan reactividad cruzada con otros antígenos. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Second Edition, Paul, ed., Raven Press (1989) en las páginas 332-336 para obtener una argumentación referente a la especificidad de los anticuerpos. Preferentemente, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión de antígenos de la invención es aquel que se une al péptido de la Figura 1 con una K_d menor de aproximadamente 100 nM, y con mayor preferencia se une al péptido de la Figura 1 con una K_d menor de aproximadamente 5 nM, todo ello medido con el Ensayo de Afinidad BIAcore, que se describe en la Sección 6.4. Se observa que un anticuerpo que se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células puede aun así representar un anticuerpo que se une específicamente al CA 125/O772P, incluyendo CA 125/O772P desprendido, con respecto a otros antígenos que no sean CA 125/O772P. Finalmente, se observa que los términos "específicamente" e "inmunoespecíficamente", como se usan en el presente documento, a no ser que se indique lo contrario, se usan de manera intercambiable.

Ensayo de especificidad ELISA: Este ensayo, como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo ELISA descrito

a continuación en la Sección 6.2. Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo en este ensayo (es decir, es específico para el CA 125/O772P) si presenta una absorbancia de entre al menos 5 y más de 30 DO/microgramo de anticuerpo.

Ensayo de especificidad por citometría de flujo: Este ensayo, como se usa en el presente documento, se refiere al

ensayo de citometría de flujo descrito a continuación en la Sección 6.2. Los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos) se consideran positivos (es decir, son específicos para el CA 125/O772P) si presentan un resultado del Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo dentro de los siguientes intervalos de células positivas: menos que el 5 % de células NIH/3T3 positivas, y al menos el 60 % de células NIH/3T3 positivas que producen un polipéptido de SEQ ID NO:2; y/o menos que el 25 % de células SK-OV3 positivas y al menos el 80 % de células OVCAR-3 positivas.

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

15 Ensayo de competición cruzada ELISA: Este ensayo, como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo ELISA descrito a continuación en la Sección 7.0. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compite por unirse en este ensayo si la CI_{50} para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

20 Ensayo de competición cruzada FACS: Este ensayo, como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo FACS descrito a continuación en la Sección 7.0. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compite por unirse en este ensayo si la CI_{50} para el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

La expresión "CA 125/O772P" o "polipéptido CA 125/O772P", como se usa en el presente documento, se refiere al polipéptido transmembrana CA 125/O772P predesprendido que, una vez desprendido, produce el polipéptido CA 125/O772P desprendido y el polipéptido CA 125/O772P asociado a células. Se ha demostrado recientemente que la secuencia de aminoácidos publicada en la bibliografía como la secuencia de longitud completa del polipéptido CA 125/O772P no representa, de hecho, la secuencia de CA 125/O772P de longitud completa. En particular, véanse, por ejemplo, los documentos WO 02/06317 (PCT/US01/22635) y US 2003/0124140, que divulgan un polipéptido denominado como "O772P." La secuencia de aminoácidos del O772P incluye una extensión de la cual se pensaba previamente que era el CA 125 de longitud completa. Debido a que el polipéptido se denomina en la técnica como CA 125 o como O772P, el mismo se denomina en el presente documento como "CA 125/O772P".

Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno relacionado con el CA 125/O772P" se refiere a un trastorno que implica o está caracterizado por la presencia de un nivel diferencial de CA 125/O772P asociado a células con respecto a un estado normal correspondiente y/o una sobreabundancia de CA 125/O772P desprendido con respecto a un estado normal correspondiente. Por ejemplo, en el caso del cáncer de ovario, se observa un nivel superior de CA 125/O772P asociado a células o desprendido con respecto al nivel observado en un estado normal (por ejemplo, no canceroso). El nivel diferencial de CA 125/O772P asociado a células y/o desprendido puede ser o bien causante o bien indicativo del trastorno.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "CA 125/O772P asociado a células" se refiere a una especie de polipéptido extracelular CA 125/O772P que permanece en la forma asociada a células, aunque de manera temporal; por ejemplo, antes de la renovación, después de que una parte del polipéptido CA 125/O772P predesprendido se haya liberado como CA 125/O772P desprendido. Por ejemplo, una especie de CA 125/O772P asociado a células es una especie de polipéptido extracelular CA 125/O772P que permanece en la forma asociada a células en la superficie de células de la línea celular OVCAR-3 (HTB-161; ATCC®) o células ascíticas humanas después de que una parte del polipéptido CA 125/O772P se haya liberado como CA 125/O772P desprendido. Una especie de polipéptido asociado a células CA 125/O772P está presente dentro de los residuos de aminoácidos de 1 a 708 de SEQ ID NO:1 y dentro de los residuos de aminoácidos de 1 a 711 de SEQ ID NO:2. Además, el CA 125/O772P se puede escindir en un sitio de escisión por proteasas situado en los residuos de aminoácidos de 659 a 665 de SEQ ID NO:2. Véase O'Brien et al., *Tumour Biol.* 23(3):154-169 (2002). Como tal, un polipéptido CA 125/O772P asociado a células puede incluir residuos de aminoácidos de 659 a 711 de SEQ ID NO:2.

La expresión "Ensayo de Citotoxicidad Dependiente de Complemento" (Ensayo de CDC), como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo de CDC descrito en la Sección 6.5 a continuación. Como tal, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que media la lisis de células tumorales en un ensayo de CDC es

aquel que se considera positivo cuando se somete a prueba en el ensayo de CDC descrito a continuación en la Sección 6.5.

Como se usan en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable para referirse a una afección en un sujeto.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" en la expresión "fragmento de anticuerpo de unión a antígenos" se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 110 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos aproximadamente 120 residuos de aminoácidos contiguos, de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo que se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células.

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

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

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" en el contexto de un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se refiere a un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que está sustancialmente exento de material celular o proteínas contaminantes de la fuente celular o de tejido de la cual se deriva u obtiene, o sustancialmente exento de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente exento de material celular o proteína contaminante" incluye preparaciones de un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en las que el péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos está separado de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o produce de manera recombinante. Por lo tanto, un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que está sustancialmente exento de material celular o proteína contaminante incluye preparaciones de un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que tiene menos de aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 10 %, o aproximadamente un 5 % (en peso seco) de otra proteína. Cuando el péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se produce de manera recombinante, preferentemente, el mismo también está exento sustancialmente de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 10 %, o aproximadamente el 5 % del volumen de la preparación de la proteína. Cuando el péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se produce mediante síntesis química, preferentemente, el mismo está sustancialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos es decir, está separado de precursores químicos u otros productos químicos que participen en la

síntesis del péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos. Por consiguiente, dichas preparaciones de un péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos tienen menos de aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 5 % (en peso seco) de precursores o compuestos químicos que no sean el péptido, polipéptido, proteína de fusión, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de interés.

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

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

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

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

La expresión "enlazado operativamente" como se usa en el presente documento en el contexto de un polipéptido de fusión se refiere a cualquier interacción covalente o no covalente que conecta el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos con el agente heterólogo. El enlace operativo puede ser directo o indirecto.

Por ejemplo, puede haber una secuencia de aminoácidos presente entre el anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) y el agente heterólogo. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo que "se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células", "se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células", "se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células con respecto a CA 125/O772P desprendido" o "se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que resulta positivo cuando se somete a prueba en un Ensayo de Competición ELISA o un Ensayo de Competición por Citometría de Flujo, según se describe en el presente documento. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es aquel que resulta positivo tanto en un Ensayo de Competición ELISA como en un Ensayo de Competición por Citometría de Flujo, como se describe en el presente documento.

Ensayo de competición ELISA: Este ensayo, como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo ELISA descrito a continuación en la Sección 6.3. Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo en este ensayo (es decir, se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células) si el mismo presenta menos de aproximadamente un 25 % de inhibición de la unión en un exceso de 25 veces p/p de CA

125/O772P desprendido con respecto al péptido de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1).

Ensayo de competición por citometría de flujo: Este ensayo, como se usa en el presente documento, se refiere al ensayo de citometría de flujo descrito a continuación en la Sección 6.3. Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo (es decir, se considera que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células) si el mismo presenta una CI_{50} , según se mide mediante porcentaje de células positivas, de al menos 0,05 mg/ml de CA 125/O772P desprendido, es decir, si el mismo requiere al menos 0,05 mg/ml de CA 125/O772P desprendido para reducir el porcentaje de células positivas en el Ensayo de Competición por Citometría de Flujo en la mitad.

10

Como se usan en el presente documento, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a impedir la recidiva o aparición de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P o uno o más síntomas de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P en un sujeto.

15 Como se usa en el presente documento, un "protocolo" incluye esquemas de dosificación y regímenes de dosificación. Los protocolos en el presente documento son métodos de uso e incluyen protocolos profilácticos y terapéuticos.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido CA 125/O772P desprendido" se refiere a una secuencia polipeptídica extracelular CA 125/O772P que llega a separarse y liberarse de polipéptidos CA 125/O772P expresados en la superficie de células que expresan el CA 125/O772P, dejando una especie de CA 125/O772P asociada a células que permanece sobre la superficie celular, aunque de manera temporal. La expresión, como se usa en el presente documento, se refiere a una especie de CA 125/O772P desprendido que se encuentra en suero humano y/o sobrenadante de cultivo de línea celular OVCAR-3 (HTB-161; ATCC). Dichos polipéptidos CA 25/O772P desprendidos se pueden obtener a través del protocolo de Frailes et al., Tumour Biol. 14/(1) 18-29 (1993), usando ascitis humana o sobrenadantes de OVCAR-3. Como alternativa, se pueden obtener polipéptidos CA 125/O772P desprendidos a través de fuentes comerciales tales como Fitzgerald Industries International (Concord, MA), Scripps Laboratories (La Jolla, CA) o United States Biochemical Corp (Cleveland, OR).

30 Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan de manera intercambiable. Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, preferentemente un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, burro, cabra, camello, gato, perro, cobaya, rata, ratón, oveja) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cynomolgus, un gorila, un chimpancé y un ser humano), preferentemente un ser humano. En una realización, el sujeto es un sujeto con cáncer, 35 como cáncer de ovario.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la mejora de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P que es el resultado de la administración de uno o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos.

40

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

45

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1: Representa la secuencia de aminoácidos de tres repeticiones de CA 125/O772P (SEQ ID NO:1). Los residuos en cursiva desde el aminoácido 14 al aminoácido 452 representan regiones repetitivas. Cada una de las tres repeticiones dentro de la región repetitiva de 14 a 452 está delimitada por líneas verticales y flechas, como se muestra. Los residuos subrayados representan la región no repetitiva proximal a la transmembrana. La secuencia que viene a continuación de los residuos subrayados no es parte del CA 125/O772P e incluye una etiqueta carboxi-Myc-His.

50 FIG. 2: Representa la secuencia de aminoácidos de tres repeticiones TM de CA 125/O772P (SEQ ID NO:2). Los residuos subrayados, en cursiva, es decir, desde el aminoácido 14 al aminoácido 452, representan regiones repetitivas. Cada una de las tres repeticiones dentro de la región repetitiva de 14 a 452 está delimitada por líneas verticales y flechas, como se muestra. Los residuos subrayados, que no están en cursiva, es decir, desde el aminoácido 453 al aminoácido 711, representan la región no repetitiva proximal a la transmembrana. Los residuos en cursiva, no subrayados, es decir, desde el aminoácido 712 al aminoácido 738, representan el dominio de 60 transmembrana. Los residuos en negrita, es decir, desde el aminoácido 739 al aminoácido 769, representan una

región citoplasmática. La secuencia que viene a continuación de los residuos en negrita no es parte del CA 125/O772P e incluye una etiqueta carboxi-Myc-His.

- FIG. 3: Muestra una gráfica representativa de un ensayo de competición FACS de concentraciones de CA 125/O772P desprendido con respecto al porcentaje de células positivas para, en este caso, el anticuerpo 117.1 y el control de anticuerpo M11 (cuadrados). Como se muestra, se puede hacer que el M11 compita por unirse a células OVCAR-3, incluso con bajas concentraciones de CA 125/O772P desprendido ($CI_{50} = 0,003$ mg/ml), mientras que no se puede hacer que el 117.1 compita, ni siquiera con concentraciones altas de CA 125/O772P desprendido (CI_{50} mayor de 1 mg/ml).
- FIG. 4: Muestra una gráfica representativa de un ensayo de ADCC del porcentaje de lisis con respecto a la concentración de anticuerpos para el anticuerpo 117.1 (media de 4 donantes independientes). Como se muestra en la figura, el anticuerpo 117.1 media la lisis específica de células OVCAR-3 de una manera dependiente de la dosis.
- FIG. 5A: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:35) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 117.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 5B: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:36) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 117.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 5C: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:27) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 117.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 5D: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:28) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 117.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 6A: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:37) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 368.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 6B: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:38) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 368.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 6C: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:29) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 368.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 6D: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:30) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 368.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 7A: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:39) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 501.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 7B: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:40) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 501.1. La secuencia nucleotídica que codifica secuencias líderes tiene un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 7C: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:31) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 501.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 7D: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:32) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 501.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 8A: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:41) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 776.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 8B: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:42) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 776.1. Las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias líderes tienen un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 8C: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:33) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 776.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 8D: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:34) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 776.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.
- FIG. 9A: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:52) que codifica la región de cadena ligera variable del

anticuerpo monoclonal 725.1. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 9B: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:57) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 725.1. Las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias líderes tienen un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 9C: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:54) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 725.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 9D: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:53) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 725.1. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 10A: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:59) que codifica la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 16H9. La secuencia nucleotídica que codifica la secuencia líder tiene un subrayado doble, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 10B: Representa la secuencia nucleotídica (SEQ ID NO:58) que codifica la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 16H9. Las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias líderes tienen un doble subrayado, y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 10C: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:56) de la región de cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal 16H9. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 10D: Representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:55) de la región de cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal 16H9. La secuencia líder tiene un doble subrayado, y las secuencias de CDR tienen un subrayado sencillo.

FIG. 11: Representa los resultados de un análisis de western blot de sobrenadantes de OVCAR-3. En el ejemplo práctico que se presenta a continuación en la Sección 6.7, se indican la concentración y la detección de anticuerpos. "3 Rpt Ptn" en cada transferencia (*blot*) se refiere a vías que contienen polipéptido recombinante de 3 repeticiones O772P; el resto de las vías en cada transferencia contiene medios condicionados por OVCAR-3 o de control. El anticuerpo particular sometido a prueba se indica en la parte inferior de cada transferencia (es decir, anticuerpos M11, OC125, 776.1 y 368.1). A la izquierda de la figura, se indican marcadores de peso molecular.

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

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa, en parte, en el reconocimiento de que los acontecimientos que producen CA 125/O772P desprendido dejan también una parte de la región extracelular de la secuencia de aminoácidos de CA 125/O772P en una forma asociada a células, es decir, producen también CA 125/O772P asociado a células. La invención descrita de forma detallada en el presente documento se basa, en parte, en el reconocimiento de que se pueden generar anticuerpos, y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión y análogos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células con respecto a CA 125/O772P desprendido, y de que dichos anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión y análogos se pueden utilizar, por ejemplo, para prevenir, manejar, tratar, o mejorar un trastorno relacionado con el CA 125/O772P o uno o más síntomas de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, tal como un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, incluido cáncer de ovario.

Tal como se analiza en todo el documento, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención son aquellos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, como se define en las reivindicaciones. De modo similar, los polipéptidos de fusión y análogos de la invención se unen también de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, como se define en las reivindicaciones. Como también se indica en el presente documento, debido al hecho de que hay CA 125/O772P asociado a células presente, antes del desprendimiento del CA 125/O772P, como parte del CA 125/O772P predesprendido, se observa que los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptidos de fusión de la invención también se pueden unir a CA 125/O772P predesprendido. Por lo tanto, si bien no se desea quedar sujeto a un mecanismo o teoría en particular a partir de lo anterior, se observa que los métodos descritos en esta sección se pueden lograr mediante la unión del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión de la

invención administrados a CA 125/O772P predesprendido además de su unión a CA 125/O772P asociado a células, o en lugar de dicha unión.

5.1. Anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une de manera preferente a un polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto a un polipéptido CA 125/O772P desprendido, como se define en las reivindicaciones. Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención son útiles para una variedad de fines terapéuticos, 10 profilácticos, diagnósticos y de purificación, según se describe en el presente documento.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención es aquel que se une a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2, y que se une de manera preferente a CA 125/O772P, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención se une a la región no repetitiva representada en la SEQ ID NO: 1 o 15 la SEQ ID NO:2. En otra realización de la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención se une a una región repetitiva representada en la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.

En una primera realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención presenta, en un Ensayo de Competición ELISA, menos de aproximadamente un 25 %, menos de aproximadamente un 20 %, 20 menos de aproximadamente un 15 %, menos de aproximadamente un 10 % o menos de aproximadamente un 5 % de inhibición de la unión al péptido de la Figura 1 en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/O772P desprendido con respecto al péptido de la Figura 1 y/o en una segunda realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención presenta, en un Ensayo de Competición por Citometría de Flujo, una CI_{50} , según se mide por el porcentaje de células positivas, de al menos aproximadamente 25 0,05 mg/ml, al menos aproximadamente 0,1 mg/ml, al menos aproximadamente 0,25 mg/ml, al menos aproximadamente 0,5 mg/ml, al menos aproximadamente 0,75 mg/ml, o al menos aproximadamente 1,0 mg/ml de CA 125/O772P desprendido. En una tercera realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la divulgación se une al péptido de la Figura 1, pero no se une de manera detectable al polipéptido CA 125/O772P desprendido. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que satisfaga cualquiera de 30 estas tres realizaciones constituye un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido, según la divulgación. En la invención, la primera y/o la segunda realización son obligatorias.

Entre los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención se encuentran anticuerpos o 35 fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen al péptido de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) con una K_d menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 1 nM, menor de aproximadamente 100 pM, o menor de aproximadamente 10 pM, según se mide por medio del Ensayo de Afinidad BIAcore, que se describe en la Sección 6.4 a continuación.

40 Entre las realizaciones preferidas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la divulgación se encuentran anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que median la lisis de células tumorales positivas para CA 125/O772P en un ensayo de ADCC. Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos incluyen, por ejemplo, aquellos que median al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 % o al 45 menos aproximadamente un 50 % de la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 50:1 y una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 % o al menos aproximadamente un 50 % de la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 25: 1 y 50 una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 % o al menos aproximadamente un 50 % de la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 12,5: 1 y una concentración de 5 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; que median al menos aproximadamente un 10 %, al menos 55 aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 % o al menos aproximadamente un 50 % de la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P positivo en un ensayo de ADCC con una relación de efector:diana 12,5:1 y una concentración de 0,5 μ g de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml; o que median al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 % de 60 la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de ADCC con una relación de

efector:diana 12,5: 1 y una concentración de 50 ng de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml.

Las realizaciones preferidas de la divulgación incluyen también anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que median la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P en un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos incluyen, por ejemplo, aquellos que median la lisis en un intervalo de aproximadamente un 15 % de lisis a 5 µg/ml a aproximadamente un 95 % de lisis a 0,1 µg/ml.

Las realizaciones preferidas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la invención incluyen también anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que inhiben el crecimiento tumoral positivo para el CA 125/O772P. Por ejemplo, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos son aquellos que, de manera preferente, inhiben el crecimiento tumoral positivo para el CA 125/O772P en modelos animales tales como los descritos en Treskes et al., *Bur. J. Cancer*. 30A(2):183-187 (1994); Ahmad et al., *Oncol. Res.* 11(6):273-280 (1999); y Kievit et al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 38(2):419-428 (1997), y el modelo animal de tumor por xenoinjerto de OVCAR-3 descrito a continuación en la Sección 6.8.

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

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la divulgación es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que compite con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5109), o por el hibridoma 7A11 (Acceso ATCC® N.º PTA-5110), o por el hibridoma 7C6 (Acceso ATCC® N.º PTA-5111), o por el hibridoma 7F10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5112), o por el hibridoma 7G10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5245), o por el hibridoma 7H1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5114), o por el hibridoma 8A1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5115), o por el hibridoma 8B5 (Acceso ATCC® N.º PTA -5116), o por el hibridoma 8C3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5246), o por el hibridoma 8E3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5118), o por el hibridoma 8G9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5119), o por el hibridoma 15C9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5106), o por el hibridoma 16C7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5107), o por el hibridoma 16H9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5108), o por el hibridoma 117.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4567), o por el hibridoma 325.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5120), o por el hibridoma 368.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4568), o por el hibridoma 446.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5549), o por el hibridoma 501.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4569), o por el hibridoma 621.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5121), o por el hibridoma 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), o por el hibridoma 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), o por el hibridoma 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5124), o por el hibridoma 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570) para unirse al CA 125/O772P asociado a células. Se considera que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de la divulgación compiten por unirse si compiten por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA y/o un Ensayo de Competición Cruzada FACS. Se considera que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos compite por unirse en un Ensayo de Competición Cruzada ELISA o un Ensayo de Competición Cruzada FACS si la CI_{50} para el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 100 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos. En una realización preferida, la CI_{50} del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor es una concentración no mayor que aproximadamente 10 veces por encima de la concentración del anticuerpo o fragmento de unión a antígenos. En una realización de mayor preferencia, la CI_{50} del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos competidor no es mayor que un valor aproximadamente equimolar respecto de la concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.

En otra realización particular, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:27 (117.1L). En otra realización particular más, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:29 (368.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:28 (117.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H) o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:31 (501.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:28 (117.1H), SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H) o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:33 (776.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:28 (117.1H), SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H) o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:54 (725.1L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H) o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos divulgado es aquel que comprende una región variable polipeptídica de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:33 (16H9L) y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30 (368.1H), SEQ ID NO:32 (501.1H), SEQ ID NO:34 (776.1H), SEQ ID NO:53 (725.1H) o SEQ ID NO:55 (16H9H).

En una realización particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos divulgado puede comprender una región de cadena ligera variable que comprende una, dos o tres CDR VL cualesquiera representadas en la Tabla 1,

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

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

En otra realización preferida más, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos divulgado puede comprender una región de cadena ligera variable y una región de cadena pesada variable, comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDR VL cualesquiera representadas en la Tabla 1 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDR VH cualesquiera representadas en la Tabla 1; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDR VL cualesquiera representadas en la Tabla 2

y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDR VH cualesquiera representadas en la Tabla 2; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDR VL cualesquiera representadas en la Tabla 3 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDR VH cualesquiera representadas en la Tabla 3; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDR VL cualesquiera representadas en la Tabla 4 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDR VH cualesquiera representadas en la Tabla 4; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDR VL cualesquiera representadas en la Tabla 5 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDR VH cualesquiera representadas en la Tabla 5; o comprendiendo dicha región de cadena ligera variable dos o tres CDR VL cualesquiera representadas en la Tabla 6 y comprendiendo dicha región de cadena pesada variable dos o tres CDR VH cualesquiera representadas en la Tabla 6.

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

TABLA 1

Secuencias CDR de 117.1		
CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
VH1	GFSLSTPGMGVG	3
VH2	HIWWDDFKRDNP ALKS	4
VH3	VDGNFLSWYFDV	5
VL1	RSSQSLVHSGNTYLH	6
VL2	KVSNRFS	7
VL3	SQSRYVPET	8

TABLA 2

Secuencias CDR de 368.1		
CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
VH1	GYSFTGFYMH	9
VH2	YVSCYTGATTYTQKFKG	10
VH3	EGDYYSMDF	11
VL1	RSSQSLERTNGNTYLH	12
VL2	KVSSRFS	13
VL3	SQTTHGPPT	14

TABLA 3

Secuencias CDR de 501.1		
CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
VH1	GYIFTDYGMN	15
VH2	CINTYTGETIYSDDFRG	16
VH3	GNYRDAIDY	17
VL1	KASQDIKSYLS	18
VL2	YATTLAD	19
VL3	LHHDESPFT	20

30

TABLA 4

Secuencias CDR de 776.1		
CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
VH1	GYTFTDYNIH	21
VH2	YIYPYNGVSDYNQNF	22
VH3	RWDFGSGYYFDY	23
VL1	RASSSVIYMC	24
VL2	GTSTLAS	25
VL3	QQWSSNPFT	26

TABLA 5

Secuencias CDR de 725.1		
CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
VH1	GYSFTNYGMN	60
VH2	WINAYIGEPTY ADDFKG	61
VH3	GGNSLDF	62
VL1	RASSSVSSIH	63
VL2	ATSNLAS	64
VL3	QQWSIDPAT	65

TABLA 6

Secuencias CDR de 16H9		
CDR	Secuencia	SEQ ID NO:
VH1	GFNIKDTYMH	66
VH2	RIDPANGNTKYDPKFQG	67
VH3	SDIYYGNPGGFAY	68
VL1	TASSSVSSSYLH	69
VL2	STSNLAS	70
VL3	HQYHRSPFT	71

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

10 Los anticuerpos pueden incluir, a título ilustrativo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos trispecíficos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos de cadena sencilla, F_{vs} con enlaces disulfuro, F_{vs} de cadena sencilla, o anticuerpos anti-idiotipo. En una realización preferida, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de CA 125/O772P asociado a células o pueden ser específicos tanto para un epítomo de CA 125/O772P asociado a células como para un epítomo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, Tutt et al., J. Immunol. 147(1):60-69 (1991); Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992); y las

20 Patentes de Estados Unidos N.º 4.474.893, 4.714.681, 4.925.648, 5.573.920, 5.601.819, 5.798.229, 5.855.866, 5.869.620, 5.897.861, 5.959.084, 6.106.833, 6.248.332, 6.258.358, 6.303.755, y 6.420.140.

Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos divulgados pueden incluir, a título ilustrativo, fragmentos Fab, 25 fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos que contienen polipéptido de cadena ligera variable (VL), fragmentos que contienen polipéptido de cadena pesada variable (VH), o fragmentos que contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR).

Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos divulgados pueden ser de cualquier clase 30 de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser anticuerpos de clase IgG, IgM, IgB, IgD, IgA o IgY. Los anticuerpos pueden ser también de cualquier isotipo. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser de un isotipo de cadena pesada IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ o IgA₂. Preferentemente, el anticuerpo es de un isotipo IgG₁.

Asimismo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos pueden comprender una o más CDR, 35 por ejemplo, secuencias de CDR según se describe en el presente documento, insertadas dentro de regiones

estructurales que se produzcan de forma natural o de consenso, preferentemente regiones estructurales humanas. Además, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos pueden comprender una cadena ligera variable, por ejemplo, una región variable de cadena ligera κ o α , y/o una cadena pesada variable según se describe en el presente documento, insertada dentro de regiones estructurales que se produzcan de forma natural o de consenso, preferentemente regiones estructurales humanas. Dichas regiones estructurales son bien conocidas para aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, pueden comprender una región constante Cy1 o una región constante Cy4.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves, por ejemplo, pollos, y mamíferos, incluyendo no primates (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un caballo, un burro, una cabra, un camello, un gato, un perro, una cobaya, una rata, un ratón, una oveja) y primates (por ejemplo, un mono, tal como un mono cynomolgus, un gorila, un chimpancé, y un ser humano). Preferentemente, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células son anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados, que incluyen anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos. Como se usan en el presente documento, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos "humanos" incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de ratones que expresan anticuerpos de genes humanos.

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

En otra realización, un hibridoma puede ser un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales que compiten con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5109), hibridoma 7A11 (Acceso ATCC® N.º PTA-5110), hibridoma 7C6 (Acceso ATCC® N.º PTA-5111), hibridoma 7F10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5112), hibridoma 7G10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5245), hibridoma 7H1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5114), hibridoma 8A1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5115), hibridoma 8B5 (Acceso ATCC® N.º PTA-5116), hibridoma 8C3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5246), hibridoma 8E3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5118), hibridoma 8G9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5119), hibridoma 15C9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5106), hibridoma 16C7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5107), hibridoma 16H9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5108), hibridoma 117.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4567), hibridoma 325.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5120), hibridoma 368.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4568), hibridoma 446.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5549), hibridoma 501.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4569), hibridoma 621.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5121), hibridoma 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), hibridoma 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), hibridoma 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5124), o hibridoma 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570) para unirse al CA 125/O772P asociado a células.

5.2 Polipéptidos de fusión

En otro aspecto, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, es decir, uno que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido, enlazado operativamente a un agente heterólogo. Los polipéptidos de fusión también se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células. En una realización de un polipéptido de fusión, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, y el agente heterólogo pueden estar enlazados operativamente a través de una unión covalente, tal como un enlace peptídico o una unión disulfuro. En otra realización de un polipéptido de fusión de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, y el agente heterólogo pueden estar enlazados operativamente a través de una unión no covalente. El agente heterólogo puede estar enlazado al extremo amino, el extremo carboxilo, o en cualquier punto a lo largo de la secuencia contigua de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a

antígenos. No es necesario que el enlace operativo se produzca directamente entre el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos y el agente heterólogo, sino que se puede producir, por ejemplo, a través de un agente o secuencia enlazadores o separadores.

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

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

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

En una realización, los polipéptidos de fusión comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, enlazado operativamente a un agente heterólogo que proporciona un potencial beneficio terapéutico. Por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células se puede enlazar operativamente a una fracción terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente, o un ión radioactivo, como emisores alfa. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.624.827, 5.643.573, 5.789.554, 5.824.782, 5.994.151, 6.042.829, 6.074.644, 6.099.842, 6.132.722, 6.187.287, 6.197.299 y 6.207.805. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para el crecimiento celular o la viabilidad celular. Los ejemplos de una citotoxina o agente citotóxico incluyen, a título ilustrativo, paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracenediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Otros agentes que tienen un potencial beneficio terapéutico incluyen, a título ilustrativo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloroetamina, tioepa clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), maitansinoides y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina) y material radioactivo incluidos, a título ilustrativo, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), cobalto (^{57}Co), flúor (^{18}F), gadolinio (^{153}Gd , ^{159}Gd), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutenio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), escandio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^3H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), itrio (^{90}Y) y cinc (^{65}Zn).

Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se puede conjugar a un agente terapéutico o resto farmacológico. Los agentes terapéuticos o restos farmacológicos no deben considerarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina como abrina, ricina A, exotoxina de *Sedomonas* (es decir, PE-40), o toxina diftérica, ricina, gelonina, y proteína antiviral de fitolaca, una proteína como el factor de necrosis tumoral, los interferones incluyen, a título ilustrativo, interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (TPA), un agente apoptótico (por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I según se divulga en la Publicación PCT N.º WO 97/33899), AIM II (véase, Publicación PCT N.º WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., *J. Immunol.*, 6:1567-1574, 1994), y VEGF (Publicación PCT N.º WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antiangiogénico (por ejemplo, antistatina o endostatina), o un modificador de la respuesta biológica como, por ejemplo, una limfocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6

("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos- macrófagos ("GM-CSF"), y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), factor estimulante de colonias de macrófagos ("M-CSF"), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")); proteasas o ribonucleasas.

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

15

Los ejemplos no limitativos de enzimas adecuadas que se pueden conjugar a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos incluyen 8-lactamasas, 8-galactosidasas, fosfatasas, peroxidases, reductasas, esterasas, hidrolasas, isomerasas y proteasas, tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; entre los ejemplos no limitativos de complejos de grupos protésicos adecuados
20 se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos no limitativos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacilamina fluoresceína, proteína verde fluorescente, proteína roja fluorescente, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo no limitativo de un material luminiscente incluye luminol. Los ejemplos no limitativos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen
25 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{90}Y .

25

La presente divulgación abarca también anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células fusionado a secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. Por ejemplo, una secuencia marcadora de aminoácidos puede ser un péptido de
30 hexa- histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86(3):821-824 (1989), la histidina, por ejemplo, hexa-histidina, proporciona una purificación adecuada de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, a título ilustrativo, la etiqueta hemaglutinina "HA", que se corresponde con un epítopo derivado de la proteína hemaglutinina
35 de la influenza (Wilson et al., Cell. 37(3):767-778 (1984)) y la etiqueta "indicador" (Brizzard et al., Biotechniques. 16(4):730-735 (1994)). Preferentemente, dichas etiquetas o secuencias marcadoras se escinden del polipéptido de fusión antes del uso, por ejemplo, el uso como parte de un método terapéutico.

Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA
40 125/O772P asociado a células también puede enlazarse operativamente, por ejemplo, a un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado según se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980.

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

Los métodos para fusionar o conjugar polipéptidos a las regiones constantes de anticuerpos son conocidos en la
55 técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.648.218, 5.723.125, 5.783.181, 5.908.626, 5.844.095, 5.112.946, 6.030.613, 6.086.875, 6.194.177, 6.238.667, 6.262.026 y 6.277.375; EP 307.434; el documento EP 367.166; EP 394.827; Publicación PCT WO 91/06570; Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88(23):10535-10539 (1991); Trauneker et al., Nature. 331(6151):84-86 (1988); Zheng et al., J. Immunol. 154(0):5590-5600 (1995) y Vie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
60 89(23): 11337-11341 (1992).

5.3. Análogos

Entre los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y polipéptidos de fusión se incluyen también análogos de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos y de polipéptidos de fusión que se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células con respecto al CA 125/O772P desprendido, según se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, entre los análogos descritos se encuentran análogos del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5109), hibridoma 7A11 (Acceso ATCC® N.º PTA-5110), hibridoma 7C6 (Acceso ATCC® N.º PTA-5111), hibridoma 7F10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5112), hibridoma 7G10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5245), hibridoma 7H1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5114), hibridoma 8A1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5115), hibridoma 8B5 (Acceso ATCC® N.º PTA-5116), hibridoma 8C3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5246), hibridoma 8E3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5118), hibridoma 8G9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5119), hibridoma 15C9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5106), hibridoma 16C7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5107), hibridoma 16H9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5108), hibridoma 117.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4567), hibridoma 325.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5120), hibridoma 368.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4568), hibridoma 446.1 (Acceso ATCC® N.º PTA- 5549), hibridoma 501.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4569), hibridoma 621.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5121), hibridoma 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), hibridoma 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), hibridoma 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5124), hibridoma 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570), o análogos de fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos de los mismos.

20

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

En una realización específica, un análogo de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, comprende una secuencia de aminoácidos que es, preferentemente, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5109), hibridoma 7A11 (Acceso ATCC® N.º PTA-5110), hibridoma 7C6 (Acceso ATCC® N.º PTA-5111), hibridoma 7F10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5112), hibridoma 7G10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5245), hibridoma 7H1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5114), hibridoma 8A1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5115), hibridoma 8B5 (Acceso ATCC® N.º PTA-5116), hibridoma 8C3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5246), hibridoma 8E3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5118), hibridoma 8G9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5119), hibridoma 15C9 (Acceso ATCC®

60

N.º PTA-5106), hibridoma 16C7 (Acceso ATCC® N.º PTA- 5107), hibridoma 16H9 (Acceso ATCC® N.º PTA-51 08), hibridoma 117.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4567), hibridoma 325.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5120), hibridoma 368.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4568), hibridoma 446.1 (Acceso ATCC® N.º PTA- 5549), hibridoma 501.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4569), hibridoma 621.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5121), hibridoma 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), 5 hibridoma 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), hibridoma 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA- 5124) o hibridoma 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570).

Preferentemente, los análogos incluyen menos de aproximadamente 25, menos de aproximadamente 20, menos de aproximadamente 15, menos de aproximadamente 10, menos de aproximadamente 5, menos de aproximadamente 4, menos de aproximadamente 3 o menos de aproximadamente 2 sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos, o combinaciones de las mismas, con respecto a la molécula original. En una realización preferida, los análogos presentan sustituciones de aminoácidos conservadoras realizadas en uno o más residuos de aminoácidos de los que se predice que son no esenciales (es decir, residuos de aminoácidos que no son críticos para que el anticuerpo se una de manera específica y preferente al CA 125/O772P asociado a células). Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en la que el residuo de aminoácido se sustituye con un residuo, mimético o análogo, de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga o polaridad similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, quiosina, cisterna), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

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

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

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

El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando técnicas similares a las descritas

anteriormente, permitiendo o no huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, se cuentan típicamente solo coincidencias exactas.

Un análogo también se puede referir a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión de la divulgación que se haya modificado mediante la fijación, por ejemplo, fijación covalente, de cualquier tipo de molécula a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos premodificado correspondiente, y que se sigue uniendo de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células. Por ejemplo, y sin sentido limitativo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión se puede modificar por glicosilación, acetilación, alquilación, esterificación, lipidación, formilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Además, un análogo puede contener uno o más aminoácidos no clásicos. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin limitación, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico (4-Abu), ácido 2-aminobutírico (2-Abu), ácido 6-aminohexanoico (Ahx), ácido 2-aminoisobutírico (2-Aib), ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, B-alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como B-metil aminoácidos, Ca-metilaminoácidos, Na-metilaminoácidos, y análogos de aminoácidos en general.

En una realización, un análogo presenta una afinidad aumentada para el CA 125/O772P asociado a células con respecto a la de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión premodificado correspondiente. En otra realización específica, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión que se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células tiene una semivida sérica aumentada con respecto a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión premodificado correspondiente. Por ejemplo, un análogo puede presentar una semivida en un animal, preferentemente un mamífero y con mayor preferencia un ser humano, mayor que aproximadamente 1 día, mayor que aproximadamente 2 días, mayor que aproximadamente 3 días, mayor que aproximadamente 7 días, mayor que aproximadamente 10 días, preferentemente mayor que aproximadamente 15 días, mayor que aproximadamente 25 días, mayor que aproximadamente 30 días, mayor que aproximadamente 35 días, mayor que aproximadamente 40 días o mayor que aproximadamente 45 días.

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

También se pueden generar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que tengan una semivida incrementada *in vivo* mediante la introducción de una o más modificaciones (es decir, sustituciones, inserciones o supresiones) de aminoácidos en un dominio constante IgG, o fragmento del mismo de unión a FcRn (preferentemente un fragmento de dominio Fe o bisagra-Fe). Véase, por ejemplo, la Publicación PCT N.º WO 98/23289 y la Patente de Estados Unidos N.º 6.277.375.

50

5.4. Moléculas de ácido nucleico

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

En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de los mismos, que comprende al menos una, preferentemente dos o tres, de las CDR de cadena ligera enumeradas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 o la Tabla 6. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica de SEQ ID NO:35,

60

SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:52 o SEQ ID NO:59 que codifica al menos una, preferentemente dos o tres, de dichas CDR de cadena ligera.

5 En otra realización, una molécula de ácido nucleico codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de los mismos, que comprende al menos una, preferentemente dos o tres, de las CDR de cadena pesada enumeradas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 5 y la Tabla 6. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica de SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:57 o SEQ ID NO:58 que codifica al menos una, preferentemente dos o tres, de dichas CDR de cadena pesada.

10 En otra realización, una molécula de ácido nucleico divulgada comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de los mismos que comprende una secuencia polipeptídica de cadena ligera variable mostrada en la FIG. 5C, FIG. 6C, FIG. 7C, FIG. 8C, FIG. 9C o FIG. 10C. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO:35 (117.1), SEQ ID NO:37 (368.1), SEQ ID NO:39 (501.1), SEQ ID NO: 41 (776.1), SEQ ID NO:52 (725.1) o SEQ ID NO:59 (16H9).

20 En otra realización más, una molécula de ácido nucleico divulgada comprende una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de los mismos que comprende una secuencia polipeptídica de cadena pesada variable mostrada en la FIG. 5D, FIG. 6D, FIG. 7D, FIG. 8D, FIG. 9D o FIG. 10D. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO:36 (117.1), SEQ ID NO:38 (368.1), SEQ ID NO:40 (501.1), SEQ ID NO:42 (776.1), SEQ ID NO:57 (725.1) o SEQ ID NO:58 (16H9).

25 Entre las moléculas de ácido nucleico se encuentran moléculas de ácido nucleico que son variantes degeneradas, o que hibridan en condiciones rigurosas al complemento de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de la invención. Por ejemplo, en una realización, una molécula de ácido nucleico es aquella que hibrida bajo condiciones rigurosas al complemento de SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58 o SEQ ID NO:59. Preferentemente, dichas moléculas de ácido nucleico hibridantes de la invención codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos divulgado en el presente documento.

5.5. Composiciones farmacéuticas

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

40 Preferentemente, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo que presentan una K_d menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 1 nM, menor de aproximadamente 100 pM, o menor de aproximadamente 10 pM para el péptido de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) según se mide mediante el Ensayo de Afinidad BIAcore, como se describe en la Sección 6.4. Como alternativa, una composición farmacéutica puede comprender un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, o análogo o molécula de ácido nucleico de la invención que media la lisis de una célula tumoral positiva para el CA 125/O772P. Con mayor preferencia, una composición farmacéutica comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión, análogo o una molécula de ácido nucleico divulgados en el presente documento que codifican un polipéptido que presenta un crecimiento tumoral positivo para el CA 125/O772P, o bien por sí mismo o bien cuando se conjuga a un agente citotóxico.

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

60 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo o incompleto), excipiente, agente estabilizador, conservantes, aglutinante o vehículo para la administración de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la invención. Los

- vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Como vehículos líquidos también se pueden utilizar soluciones salinas y soluciones acuosas de
- 5 dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Entre los excipientes farmacéuticos adecuados se incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones,
- 10 suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc., de calidad farmacéutica. Se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados en Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 20ª edición, Gennaro, ed., Lippincott (2000).
- 15 En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas son estériles y se presentan en una forma adecuada para su administración a un sujeto, preferentemente un sujeto animal, de más preferencia un sujeto mamífero, y mucho más preferentemente un sujeto humano.
- 20 En una realización específica, puede resultar deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesite tratamiento. Esto se puede lograr, por ejemplo, y sin ningún carácter limitativo, mediante infusión local, mediante inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas de sialastic o fibras. Preferentemente, cuando se administran composiciones farmacéuticas, se debe tener cuidado de usar materiales en
- 25 los cuales no se adsorban los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos de la composición o composiciones farmacéuticas.
- En otra realización, la composición farmacéutica puede estar presente y se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase, por ejemplo, Langer, *Science* 249(4976):1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berest et al., eds., Liss (1989) en las páginas 353-365; Lopez-Berestein et al., *ibid.*, en las páginas 317-327; Lopez-Berestein et al., *ibid.*, en general; y las Patentes de Estados Unidos N.º RE35.338, 5.662.931, 5.759.519, 5.879.713, 6.027.726, 6.099.857, 6.132.764, 6.245.427, 6.284.375, 6.350.466 y 6.417.326).
- 30 En otra realización más, la composición puede estar presente y se puede administrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una realización, se puede usar una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véanse, por ejemplo, Langer, *Science* 249(4976):1527-1533 (1990); Sefton, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14(3):201-40 (1987); Buchwald et al., *Surgery*. 88(4):507-516 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321(9):574-579 (1989); y las Patentes de Estados Unidos N.º 5.720.720 y 6.352.683). En otra realización, se pueden
- 40 usar materiales poliméricos para lograr una liberación controlada o sostenida de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos de la divulgación o fragmentos de los mismos (véanse, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974) *Medical Applications of Controlled Release*, Langer et al., eds., CRC Press (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen et al., eds., Wiley (1984); Ranger et al., *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); Levy et al., *Science*. 228(4696):190-192 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25(4):351-356 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.*71(1):105-112 (1989); Patentes de Estados Unidos N.º 5.128.326, 5.679.377, 5.863.985, 5.912.015, 5.916.597, 5.989.463, 5.994.492, 6.011.011, 6.020.004, 6.066.325, 6.180.608, 6.190.702, 6.214.966, 6.221.958, 6.221.977, 6.267.981, 6.362.276, 6.365.173, 6.375.985, 6.394.997, y 6.399.103; y la Publicación PCT N.º WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación
- 50 sostenida incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliolefinas.
- 55 Una composición farmacéutica se formula de manera que sea compatible con su vía deseada de administración. Los ejemplos de vías de administración incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intramuscular, subcutánea), oral, intranasal, inhalación, transdérmica (tópica), transmucosal y administración rectal. En una realización específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa, subcutánea,
- 60 intramuscular, oral, intranasal o tópica para seres humanos. En una realización preferida, una composición

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

5

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

Si las composiciones farmacéuticas se van a administrar por vía intranasal, las composiciones se pueden formular en forma de aerosol, en pulverización, nebulización o en forma de gotas. En particular, los agentes para ser usados según la presente invención se pueden presentar de manera práctica en forma de pulverizador de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro más adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de gelatina, por ejemplo, para su uso en un inhalador o insuflador, que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

30

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

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

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

60

Además de las formulaciones descritas previamente, las composiciones también se pueden formular como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

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

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

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

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

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

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

5.6. Artículos de fabricación

En otro aspecto más, se divulga un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica divulgada en el presente documento y contenida dentro del material de envasado, presentándose dicha composición farmacéutica en una forma adecuada para su administración a un sujeto, preferentemente un ser humano, o en un formato que se puede diluir o reconstituir para su administración al sujeto. En una realización, el artículo de fabricación comprende además instrucciones impresas y/o una etiqueta que oriente sobre el uso o administración de la composición farmacéutica. Las instrucciones y/o etiqueta pueden, por ejemplo, sugerir un

régimen de dosificación para evitar o tratar uno o más síntomas de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, tal como un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, incluidos cáncer de ovario, de útero, de mama o de pulmón. Por lo tanto, las instrucciones y/o etiqueta pueden proporcionar un régimen de dosificación para la prevención o tratamiento de uno o más síntomas de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, tal como un trastorno proliferativo celular, por ejemplo, cáncer, incluidos cáncer de ovario, de útero, de mama o de pulmón.

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

5.7. Métodos de identificación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células

Se divulga también un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células con respecto al CA 125/O772P desprendido. En una realización, un método para identificar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células comprende hacer entrar en contacto un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos con un péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células, en presencia de CA 125/O772P desprendido, en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o bien a dicho péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células o bien al CA 125/O772P desprendido. Después de la incubación, se retiran el CA 125/O772P desprendido (con o sin fragmento unido de anticuerpo de unión a antígenos) y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos no unido, y se mide la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos unido al péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos del método satisface cualquiera de las tres realizaciones expuestas anteriormente en relación con "se une de manera preferente a", entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une de manera preferente a un polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido. En una realización preferida, la relación de CA 125/O772P desprendido con respecto al CA 125/O772P asociado a células en la mezcla de reacción es aproximadamente 25:1 (p/p). Como parte de este método, el CA 125/O772P asociado a células se puede inmovilizar en una superficie sólida. Por ejemplo, el método se puede realizar en un formato ELISA.

Se divulga también un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, que comprende hacer entrar en contacto un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos con un péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células y CA 125/O772P desprendido (por ejemplo, aproximadamente una cantidad en exceso de 25 veces (peso/peso)), en condiciones que permiten la unión del péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, retirar el péptido no unido que comprende CA 125/O772P asociado a células, medir la cantidad de péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células al que se ha unido el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos, y comparar la cantidad medida con la cantidad de péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células a la que se puede unir el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en ausencia de dicha cantidad de CA 125/O772P desprendido. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos del método satisface cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con "se une de manera preferente a", entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido. Como parte de este método, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se pueden inmovilizar en una superficie sólida, por ejemplo, el método se puede realizar en un formato ELISA. Las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, en combinación con técnicas convencionales bien conocidas para aquellos expertos en la técnica, se pueden utilizar para llevar a la práctica métodos para la identificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, como los que se divulgan. Por ejemplo, entre los ensayos que se pueden utilizar en la identificación de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos se encuentran el Ensayo de Competición ELISA descrito a continuación, en la Sección 6 y sus subsecciones.

Se divulga también un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, que comprende hacer entrar en contacto un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos con una célula que expresa el CA 125/O772P y con una

cantidad de, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,05 mg/ml de CA 125/O772P desprendido en condiciones que permiten la unión del CA 125/O772P al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, retirar células no unidas, medir la cantidad de células que expresan el CA 125/O772P al que se ha unido el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos y comparar la cantidad medida con la cantidad de células que expresan el CA 125/O772P que se une al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en ausencia de dicha cantidad de CA 125/O772P desprendido. Si el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos del método satisface cualquiera de las tres realizaciones antes expuestas en relación con "se une de manera preferente a", entonces dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es uno que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido. Se puede realizar un método de este tipo, en el que, por ejemplo, la medición se ejecute mediante técnicas de citometría de flujo, incluyendo, por ejemplo, la clasificación celular activada por fluorescencia. Las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, en combinación con técnicas convencionales bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, se pueden utilizar para llevar a la práctica dichos métodos para la identificación de anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, de la invención. Por ejemplo, entre los ensayos que se pueden utilizar en la identificación de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos se encuentran el Ensayo de Competición por Citometría de Flujo de la Sección 6 y sus subsecciones, a continuación.

Se proporcionan también anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células y que son específicos para CA 125/O772P. Los anticuerpos que son específicos para el CA 125/O772P se pueden identificar de manera rutinaria, por ejemplo, utilizando el Ensayo de Especificidad ELISA y el Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo descritos a continuación, en la Sección 6 y sus subsecciones. Como tal, se proporcionan métodos para identificar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que son específicos para el CA 125/O772P y que también se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células. En uno de dichos métodos, en primer lugar, se identifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que es específico para el CA 125/O772P, por ejemplo, utilizando un Ensayo de Especificidad ELISA y/o un Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo. A continuación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se somete a prueba en relación con una capacidad de unirse de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células utilizando, por ejemplo, uno de los métodos descritos en el presente documento.

Entre las realizaciones, también se encuentran anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células y que se unen al péptido de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) con una K_d menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 1 nM, menor de aproximadamente 100 pM, o menor de aproximadamente 10 pM según se mide por medio del Ensayo de Afinidad BIAcore, que se describe en la Sección 6.4. Dichos anticuerpos se pueden identificar de manera rutinaria, por ejemplo, adoptando el Ensayo de Afinidad ELISA descrito a continuación, en la Sección 6 y sus subsecciones. Como tales, se proporcionan los métodos para identificar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células y se unen también a CA 125/O772P asociado a células con al menos un cierto nivel mínimo de afinidad. En una de estas realizaciones, en primer lugar, se identifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células utilizando, por ejemplo, uno de los métodos descritos en el presente documento. A continuación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se somete a prueba en relación con una capacidad de unirse a CA 125/O772P asociado a células (o a un péptido que comprende el mismo) con una K_d menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 1 nM, menor de aproximadamente 100 pM o menor de aproximadamente 10 pM, utilizando, por ejemplo, una de las técnicas descritas en el presente documento.

Se divulgan también anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células y que presentan la capacidad de mediar la lisis de células positivas para el CA 125/O772P, por ejemplo, células tumorales. Dichos anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos se pueden identificar de manera rutinaria, por ejemplo, realizando los ensayos de ADCC y/o CDC que se describen a continuación, en la Sección 6 y sus subsecciones. Como tal, la presente invención proporciona métodos para identificar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células y que presentan también la capacidad de mediar la lisis de células positivas para el CA 125/O772P. En una de tales realizaciones, se puede identificar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células utilizando, por ejemplo, uno de los métodos presentados en este documento. A continuación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se somete a pruebas en relación con la capacidad de mediar la lisis de células positivas para el CA 125/O772P a través de, por ejemplo, un ensayo de ADCC y/o CDC según se describe en el presente documento.

60

Las realizaciones de la presente divulgación también incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente al CA 125/O772P y que presentan la capacidad de inhibir o ralentizar el crecimiento de tumores positivos para el CA 125/O772P. Dichos anticuerpos se pueden identificar de manera rutinaria, por ejemplo, realizando los ensayos *in vivo* previamente descritos, tales como los que se encuentran en

5 Treskes et al., Eur. J. Cancer. 30A(2):183-187 (1994); Ahmad et al., Oncol. Res. 11(6):273-280 (1999); y Kievit et al., Int. J. Radiat. Onc. Biol. Phys. 38(2):419-428 (1997). Como tal, la presente divulgación también proporciona métodos para identificar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P y que también presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales positivas para el CA 125/O772P. En una de tales realizaciones, se puede identificar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión

10 a antígenos que se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células utilizando, por ejemplo, uno de los métodos presentados en este documento. A continuación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión antígenos se somete a pruebas en relación con la capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales positivas para el CA 125/O772P a través de, por ejemplo, el análisis del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión antígenos en un sistema como los sistemas *in vivo* descritos en las citas anteriores.

15

5.8. Métodos de prevención, tratamiento, manejo o mejora de un síntoma de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P

La presente divulgación proporciona métodos para la prevención, el tratamiento o el manejo de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, o la mejora de un síntoma de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P. Por ejemplo, la presente invención proporciona métodos para la prevención, el tratamiento, el manejo o la mejora de un síntoma de un trastorno proliferativo celular, mediante la administración, a un sujeto que necesite dicha prevención, tratamiento, manejo o mejora, de una cantidad de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o análogo eficaz para producir el resultado deseado en el sujeto.

25

Tal como se describe durante todo el documento, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos divulgados son aquellos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células. De modo similar, los polipéptidos de fusión y análogos divulgados en el presente documento también se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células. Tal como también se indica en el presente documento, debido al hecho de que

30 hay CA 125/O772P asociado a células presente antes del desprendimiento del CA 125/O772P, o parte del CA 125/O772P, se observa que los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión y análogos también se pueden unir al CA 125/O772P. Por lo tanto, si bien no se desea quedar sujeto a ningún mecanismo particular o teoría a partir de lo anterior, se observa que los métodos descritos en esta sección se pueden poner en práctica, al menos en parte, mediante la unión del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a

35 antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la invención administrados a CA 125/O772P predesprendido además de su unión a CA 125/O772P asociado a células postdesprendido, o en lugar de dicha unión.

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

45 manejo o la mejora de un síntoma del cáncer de ovario.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, o mejorar un síntoma del mismo, que comprende administrarle a un sujeto que necesite dicho tratamiento o mejora, un anticuerpo, fragmento de un anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la divulgación en una cantidad suficiente para tratar el trastorno proliferativo celular o mejorar un síntoma del mismo. El trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser, por ejemplo, un trastorno proliferativo celular tal como cáncer y puede incluir, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer de mama o cáncer de pulmón. Dicha realización se lleva a la práctica preferentemente en los casos en los que el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la divulgación se conjugan a un

50 agente citotóxico útil en el tratamiento de la enfermedad proliferativa celular, tal como aquellos agentes mencionados en la Sección 5.2. En una realización particular, el agente citotóxico es un radioisótopo. En otra realización particular, el radioisótopo puede seleccionarse del grupo que consiste en ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{90}Y . Tal realización se puede llevar a la práctica como parte de una terapia combinada contra el cáncer, por ejemplo, administrándole adicionalmente al sujeto un agente quimioterapéutico, tal como paclitaxel o cisplatino, o radioterapia.

60

Se proporciona también un método para evitar un trastorno relacionado con el CA 125/O772P o un síntoma de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, que comprende administrarle a un sujeto que necesite dicha prevención un anticuerpo, fragmento de un anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo divulgados, en una cantidad suficiente para prevenir el trastorno relacionado con el CA 125/O772P, o un síntoma del mismo. El trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser, por ejemplo, un trastorno proliferativo celular como el cáncer y puede incluir, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer de mama o cáncer de pulmón.

En realizaciones adicionales, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un cáncer óseo, por ejemplo, sarcoma de Ewing, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma u otro sarcoma de tejidos blandos. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un tumor cerebral, por ejemplo, oligodendroglioma, ependimoma, meningioma, linfoma, schwannoma o meduloblastoma. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser cáncer de mama, por ejemplo, carcinoma ductal *in situ* de la mama. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un cáncer del sistema endocrino, por ejemplo, cáncer pancreático, de paratiroides, de pituitaria o de tiroides. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P es un cáncer gastrointestinal, por ejemplo, cáncer anal, colorrectal, esofágico, de vesícula, gástrico, de hígado, pancreático o de intestino delgado. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un cáncer ginecológico, por ejemplo, cáncer cervical, endometrial, de útero, de trompas de falopio, enfermedad trofoblástica gestacional, coriocarcinoma, de ovario, vaginal o vulvar. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un cáncer de cabeza y cuello, por ejemplo, cáncer de laringe, orofaringeo, de paratiroides o de tiroides. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un cáncer leucémico, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células peludas o un trastorno mieloproliferativo. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P es un cáncer de pulmón, por ejemplo, un mesotelioma, un cáncer de pulmón de células no pequeñas o un cáncer de pulmón de células pequeñas. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un linfoma, por ejemplo, linfoma relacionado con SIDA, linfoma cutáneo de linfocitos T, enfermedad de Hodgkin o enfermedad no Hodgkin. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser cáncer metastásico. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P es un mieloma, por ejemplo, un mieloma múltiple. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser cáncer pediátrico, por ejemplo, un tumor cerebral, sarcoma de Ewing, leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda o leucemia mielógena aguda), cáncer de hígado, un linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin), neuroblastoma, retinoblastoma, un sarcoma (por ejemplo, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma u otros sarcomas de tejidos blandos) o Tumor de Wilms. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser cáncer de pene. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser cáncer de próstata. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un cáncer de piel, por ejemplo, linfoma cutáneo de linfocitos T, micosis fungoide, sarcoma de Kaposi o melanoma. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P es cáncer testicular. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un cáncer de tiroides, por ejemplo, carcinoma papilar, folicular, medular, anaplásico o de tiroides indiferenciado. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P puede ser un cáncer del tracto urinario, por ejemplo, cáncer de vejiga, de riñón o de uretra. En otra realización, el trastorno relacionado con el CA 125/O772P o la afección relacionada con el cáncer pueden ser ataxiatelangiectasia, carcinoma de origen primario desconocido, síndrome de Lee-Fraumeni o timoma.

En una realización de dichos métodos de la divulgación, se administra un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos. En otra realización, se administra un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal de unión a antígenos. Típicamente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se puede administrar con una concentración de dosificación de entre aproximadamente 5 µg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, más preferentemente entre aproximadamente 20 µg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, y de mayor preferencia entre aproximadamente 100 µg/kg y aproximadamente 5 mg/kg del peso corporal del sujeto.

En general, los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar a través de la administración de una composición farmacéutica según se divulga. La toxicidad y/o eficacia de las composiciones administradas según los protocolos particulares puestos en práctica se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren composiciones que presentan índices terapéuticos elevados. Aunque se pueden usar composiciones que presentan efectos secundarios tóxicos, es preferible utilizar un sistema de aplicación que dirija dichas composiciones al sitio del tejido afectado, por ejemplo, el tejido del ovario, reduciendo de este modo los efectos secundarios.

60

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares y de estudios con animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación de composiciones para ser usadas en seres humanos. La dosificación de dichas composiciones se sitúa preferentemente dentro de un intervalo que da como resultado concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con una toxicidad pequeña o inexistente. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación utilizada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente usado en los métodos de la divulgación, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto que logra la mitad de la inhibición máxima de uno o más síntomas) según se determina en ensayos de cultivos celulares, por ejemplo, ensayos de proliferación. Dicha información se puede usar para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

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

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

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

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

En otra realización más, los métodos se pueden llevar a la práctica como parte de una terapia combinada, por ejemplo, una terapia combinada contra el cáncer. Dicha terapia combinada contra el cáncer puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente quimioterapéutico, por ejemplo, cisplatino, ifosfamida, paclitaxel, taxanos, un inhibidor de la topoisomerasa I (por ejemplo, CPT-II, topotecán, 9-AC o GG-211), gemcitabina, mitomicina, emetina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracenediona, mitoxantrona, mitramicina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal o taxol. Dicha terapia combinada contra el cáncer puede incluir de manera alternativa o adicional, pero sin limitación, radioterapia.

El uso de la expresión "terapia combinada" o "terapia combinada contra el cáncer" no limitan el orden en el que se administran los agentes o tratamientos a un sujeto con un trastorno relacionado con el CA 125/O772P. Por ejemplo, los agentes de la terapia combinada se pueden administrar simultáneamente, secuencialmente en cualquier orden o

cíclicamente a un sujeto. En una realización preferida, los dos o más componentes de la terapia combinada se administran a un sujeto simultáneamente. El término "simultáneamente" no se limita a la administración de dos o más agentes exactamente al mismo tiempo, sino que significa que los agentes se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tales que los agentes pueden actuar juntos para proporcionar un beneficio mayor que si se administrasen de otro modo.

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

5.9. Métodos de diagnóstico de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P

En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona métodos para diagnosticar un trastorno relacionado con el CA 125/O772P o la predisposición a un trastorno relacionado con el CA 125/O772P. En una realización, se pueden usar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión y análogos marcados de la divulgación con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar o monitorizar un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, tal como el cáncer.

Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión y análogos de la divulgación para someter a ensayo niveles de CA 125/O772P asociado a células en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos según se describe en el presente documento o tal como es sabido para aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101(3):976-984 (1985); Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 105(6 Pt 2):3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos, útiles para detectar la expresión génica de proteínas, incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Se conocen marcadores de ensayo adecuados para anticuerpos en la técnica y los mismos incluyen, por ejemplo, marcadores enzimáticos, tales como, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa; radioisótopos tales como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{111}In) y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); marcadores luminiscentes, tales como luminol, y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.

Un aspecto es la detección y el diagnóstico de la predisposición al cáncer, en particular, el cáncer de ovario, en un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, de manera parenteral, subcutánea o intraperitoneal) a un sujeto una cantidad de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo marcados que se unan de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, eficaces para el diagnóstico, y b) detectar el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo marcado en el sujeto con el fin de realizar dicho diagnóstico. De acuerdo con esta realización, el anticuerpo, fragmento de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo se marca preferentemente con una fracción para formación de imágenes que es detectable usando un sistema de formación de imágenes conocido para los expertos en la técnica. El nivel basal se puede determinar por varios métodos, que incluyen comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor normalizado previo determinado para un sistema particular.

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

En una realización específica, la molécula se marca con un radioisótopo y es detectada en el sujeto usando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.441.050). En otra realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el sujeto usando un instrumento de exploración sensible a la fluorescencia.

En otra realización, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el sujeto usando una PET. En otra realización más, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en el sujeto usando una MRI.

Se entenderá en la técnica que el tamaño y el peso del sujeto, así como el tipo del sistema de formación de

- imágenes usado, determinarán el tipo y la cantidad de la fracción formadora de imágenes necesaria para producir imágenes diagnósticas útiles. En el caso de una fracción de radioisótopo que contiene ^{99m}Tc , para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada normalmente será de entre aproximadamente 5 y 20 milicuries. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo marcados se acumularán entonces de manera preferente en la ubicación de células que presentan un polipéptido CA 125/O772P asociado a células. La formación de imágenes de tumores *in vivo* se describe en Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radio labeled Antibodies and Their Fragments", en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, Burchiel et al., eds., Masson Publishing Inc. (1982) en el Capítulo 13.
- 5
- 10 Dependiendo de diversas variables, que incluyen el tipo de marcador usado y el modo de administración, el intervalo de tiempo posterior a la administración para permitir que la molécula marcada se concentre de manera preferente en sitios en el sujeto y que la molécula marcada no unida se elimine hasta el nivel basal puede ser de aproximadamente entre 6 y 48 horas o aproximadamente entre 6 y 24 horas o aproximadamente entre 6 y 12 horas. En otra realización, el intervalo de tiempo tras la administración será de aproximadamente entre 5 y 20 días o
- 15 aproximadamente entre 5 y 10 días.

En una realización, la monitorización de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, por ejemplo, cáncer, se puede llevar a cabo repitiendo el método de formación de imágenes en varios puntos cronológicos, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, a los seis meses después del diagnóstico inicial y/o al año después del

20 diagnóstico inicial, y así sucesivamente.

Se incluyen métodos de diagnóstico o monitorización del cáncer que comprenden administrarle a un sujeto que necesite dicho diagnóstico o monitorización una cantidad del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo marcados que se unan de manera preferente a CA 125/O772P asociado

25 a células, suficiente para la detección, y detectar el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo marcados unidos a un órgano o tejido del sujeto. Además, se proporcionan métodos de detección de CA 125/O772P asociado a células en una muestra biológica, que comprenden hacer entrar en contacto un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo marcados que se unan de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, y detectar un anticuerpo, fragmento de

30 anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo unidos a la muestra.

En estas realizaciones, la cantidad de molécula marcada unida al CA 125/O772P asociado a células se puede comparar a continuación con una cantidad normalizada o con un control, o con la cantidad previamente detectada en el sujeto en un punto cronológico anterior.

35

5.10. Métodos de producción de anticuerpos

Se pueden producir anticuerpos de la invención mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, por ejemplo, mediante tecnología de hibridomas, síntesis química o, preferentemente, mediante

40 técnicas de expresión recombinante.

Se pueden producir anticuerpos policlonales mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede administrar un CA 125/O772P humano que comprende un polipéptido CA 125/O772P asociado a células, a varios animales huésped que incluyen, pero sin limitación, conejos, ratones, ratas y caballos, para inducir

45 la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno humano. Se pueden usar varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, y los mismos incluyen, entre otros, el adyuvante de Freund (completo o incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pruronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes son también bien conocidos en la técnica.

50

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridomas, que incluyen

55 aquellas conocidas en la técnica y descritas en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); o Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier (1981) en las páginas 563-681).

Los métodos para la producción y el cribado de anticuerpos específicos usando una tecnología de hibridomas son

60 rutinarios y bien conocidos en la técnica. De manera breve, en un ejemplo, se pueden inmunizar ratones con un

- polipéptido CA 125/O772P, por ejemplo, un polipéptido CA 125/O772P asociado a células, y una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero de los ratones, se recolecta el bazo del ratón y se aíslan esplenocitos. A continuación, los esplenocitos, mediante técnicas bien conocidas, se fusionan con cualesquiera células de mieloma adecuadas, por ejemplo, células de la línea celular SP2/0-Ag14 disponibles en el ATCC (Acceso N.º CRL-1581). Se seleccionan hibridomas y los mismos se clonan por dilución limitante. A continuación, los clones de los hibridomas se someten a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un CA 125/O772P asociado a células. Se puede generar líquido ascítico, que en general contiene altos niveles de anticuerpos, inyectando a los ratones clones de hibridomas positivos.
- 10 Se proporcionan métodos de generación de anticuerpos monoclonales, así como anticuerpos producidos por dichos métodos, que comprenden cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en donde, preferentemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados a partir de un ratón inmunizado con un polipéptido CA 125/O772P, por ejemplo, un polipéptido CA 125/O772P asociado a células, con células de mieloma, y a continuación cribando los hibridomas resultantes de la fusión en busca de clones de hibridomas que secreten un anticuerpo capaz de unirse al polipéptido CA 125/O772P, por ejemplo, un polipéptido CA 125/O772P asociado a células.
- 15 Se pueden generar fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos mediante cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden producir fragmento Fab y F(ab')₂ de la invención mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada. Además, los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar usando varios métodos de presentación en fagos, conocidos en la técnica.
- 20 En métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales sobre la superficie de partículas fágicas que llevan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. La expresión en fagos, de un dominio de unión a antígeno, que se une a un antígeno polipeptídico CA 125/O772P se puede seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie o gránulo sólido. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos, que se pueden adaptar de manera que se puedan usar para realizar o identificar los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos descritos en Brinkmann et al., *J. Immunol. Methods*. 182(1):41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods*. 184(2):177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24(4):952-958 (1994); Persic et al., *Gene*. 187(1):9-18 (1997); Burton et al., *Adv. Immunol.* 57:191-280 (1994); las Publicaciones PCT N.º WO 91/10737 y WO 95/15982; EP 853.661; y las Patentes de Estados Unidos N.º 5.223.409, 5.403.484, 5.427.908, 5.516.637, 5.571.698, 5.580.717, 5.658.727, 5.667.988, 5.698.426, 5.712.089, 5.733.743, 5.780.225, 5.789.208, 5.821.047, 5.885.793, 5.969.108, 6.096.551, 6.140.470, 6.376.170, 6.265.150 y 6.335.163.
- 30 Como se ha descrito en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpos provenientes del fago se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o un fragmento deseado de unión a antígeno, y se pueden expresar en un huésped, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levadura y bacterias, por ejemplo, como se describe a continuación. También se pueden utilizar técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N.º 5.595.898, 5.698.417 y 6.204.023; Mullinax et al., *BioTechniques*. 12(6):864-869 (1992); Sawai et al., *Am. J. Reprod. Immunol.* 34(1):26-34 (1995); y Better et al., *Science*. 240(4855):1041- 1043 (1988).
- 40 Para generar anticuerpos completos, se pueden usar cebadores de PCR que incluyen secuencias nucleotídicas VH o VL, un sitio de restricción, y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción, con el fin de amplificar las secuencias VH o VL en clones scF_v. Utilizando técnicas de clonación conocidas para aquellos expertos en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante VH, y los dominios VL amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante VL, por ejemplo, regiones constantes humanas kappa o lambda. Preferentemente, los vectores para expresar los dominios VH o VL pueden comprender un promotor EF-1α, una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable, dominios constantes, y un marcador de selección tal como la neomicina. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un vector que exprese las regiones constantes necesarias. A continuación, los vectores de expresión de cadena pesada y los vectores de expresión de cadena ligera se cotransfectan en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la técnica.
- 50
- 55
- 60

Para algunos usos, particularmente el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vivo*, puede resultar preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que se obtienen diferentes partes del anticuerpo a partir de moléculas de inmunoglobulina de diferentes especies. Por ejemplo, y sin ningún sentido limitativo, un anticuerpo quimérico puede tener regiones variables de cadena ligera y/o pesada obtenidas a partir de un anticuerpo murino y regiones constantes de cadena ligera y/o pesada obtenidas a partir de una inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, Science. 229(4719):1202-1207 (1985); Oi et al., BioTechniques. 4(3):214-221 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods. 10 125(1-2):191-202 (1989); y Patentes de Estados Unidos N.º 4.816.397, 4.816.567, y 5.807.715.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que comprende una estructura humana, que incluye una región constante humana, y una o más CDR de un anticuerpo o una especie no humana, por ejemplo, una especie murina. Dichos anticuerpos humanizados se pueden generar de manera rutinaria utilizando una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; Publicación PCT N.º WO 15 91/09967; y las Patentes de Estados Unidos N.º 5.225.539, 5.530.101, 5.585.089, 5.766.886, 5.859.205, 6.180.370 y 6.407.213), remodelación de la superficie (Patente de Estados Unidos N.º 5.639.641; documento EP 519.596; Padlan, Mol. Immunol. 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Eng. 7(6):805-814 (1994); y Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91(3):969-973 (1994)), reordenamiento de cadenas (Patentes de Estados Unidos N.º 5.565.332 y 6.455.253). En una realización preferida, los anticuerpos humanizados comprenden una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR enumeradas en la Tabla 1, la Tabla 2, la Tabla 3, la Tabla 5 o la Tabla 6 y regiones estructurales humanas. A menudo, los residuos estructurales en las regiones estructurales se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para modificar, preferentemente mejorar, la unión a antígenos. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un modelo de las interacciones de los residuos de CDR y 25 estructurales para identificar residuos estructurales importantes para la unión a antígenos y una comparación de secuencias para identificar residuos estructurales no habituales, en posiciones particulares. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.585.089, 5.770.196, y 5.869.619; y Riechmann et al., Nature. 332(6162):323-327 (1988).

Los anticuerpos completa o totalmente humanos son deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Se pueden realizar anticuerpos humanos mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos obtenidas a partir de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las Patentes de Estados Unidos N.º 4.444.887, 35 4.716.111, 5.916.771, 5.939.598, 6.075.181, 6.114.598, 6.150.584, 6.162.963, 6.235.883; la Publicación PCT WO 98/46645; y el documento EP 463.151.

También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que puedan expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos génicos de inmunoglobulina humana de cadena pesada y ligera se pueden introducir aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad se pueden introducir en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón se pueden hacer no funcionales por separado o simultáneamente con la 45 introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la supresión homocigótica de la región JH evita la producción de anticuerpos endógena. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. A continuación, los ratones quiméricos se crían para producir prole homocigótica que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera habitual con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o una parte de un polipéptido CA 125/O772P, tal como un polipéptido CA 125/O772P asociado a células. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de los ratones transgénicos, inmunizados, usando una tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana hospedados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de los linfocitos B, y posteriormente experimentan un cambio de clase y una mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e 55 IgB terapéuticamente útiles. Para obtener una visión general de esta tecnología con el fin de producir anticuerpos humanos, véase Lonberg et al., Int. Rev. Immunol. 13(1):65-93 (1995). Para un análisis detallado de esta tecnología con el fin de producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318, 5.939.598, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.150.584 y 6.162.963.

60 Adicionalmente, se puede contactar con empresas tales como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y Genpharm (San José,

CA) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

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

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

5.11. Expresión recombinante de anticuerpos y polipéptidos

La expresión recombinante de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo que se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células se puede lograr usando un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo divulgados en el presente documento. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo, se puede producir el vector para la producción del anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptido de fusión o análogo mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 4.816.567, 5.545.405 y 6.331.415.

Se pueden usar métodos que son bien conocidos para aquellos expertos en la técnica con el fin de construir vectores de expresión que contengan secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos, y señales apropiadas de control transcripcional y traduccional. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por lo tanto, la divulgación proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo divulgado en el presente documento, un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos divulgado, un polipéptido de fusión o un análogo divulgados, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una parte del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, enlazada operativamente a un promotor. Dichos vectores también pueden incluir la secuencia nucleotídica que codifica la región constante de la molécula del anticuerpo (véanse, por ejemplo, los documentos EP 216.846, EP 323.997, y la Patente de Estados Unidos N.º 5.122.464), y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o las cadenas completas tanto pesada como ligera.

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

Se puede utilizar una variedad de sistemas de huésped-vector de expresión para expresar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos divulgados (véase, por ejemplo, la Patente de estados Unidos N.º 5.807.715). Dichos sistemas de huésped-expresión representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias codificantes de interés y las mismas posteriormente se pueden purificar, aunque también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, pueden expresar anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos de la divulgación *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN cósmido, ADN plásmido o ADN bacteriófago recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos; levadura (por

ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, o *Pichia maetlanolica*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos; sistemas celulares de insectos transfectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos; sistemas de células vegetales transfectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, o TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CRO, BHK, 293, NSO, o 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus o el promotor 7.5K del virus vaccinia). Preferentemente, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante completa. Por ejemplo, las células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CRO), en combinación con un vector tal como el elemento promotor del gen precoz intermedio principal de citomegalovirus humano son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., *Gene*. 45(1):101-105 (1986) y Cockett et al., *Bio/Technology*. @:662-667 (1990). En una realización específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos, polipéptidos de fusión o análogos se regulan mediante un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor de tipo celular o específico del tejido.

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

En un sistema de insectos, se usa el virus de la polihidrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y se puede situar bajo control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). Véase, por ejemplo, Kumar et al., *Biosci. Rep.* 19(3):227-234 (1999).

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

60

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

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

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

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígenos o polipéptido de fusión se pueden incrementar mediante amplificación con vectores (para una revisión, véase Bebbington et al., *The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning*, Vol. 3, Academic Press (1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el incremento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de célula huésped hará que aumente el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada al gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.* 3(2):257-266 (1983)).

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

60

Una vez que se ha producido un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión de antígenos, polipéptido de fusión o análogo de la divulgación mediante expresión recombinante, el mismo se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno de CA 125/O772P específico después de la purificación inicial de la Proteína A, y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos divulgados en el presente documento se pueden fusionar con las secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento, o conocidas de otra manera en la técnica, para facilitar la purificación.

10

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración.

6. EJEMPLOS

15 Los resultados proporcionados en el presente documento demuestran que una porción extracelular de CA 125/O772P permanece en forma asociada a células después de que una porción del polipéptido CA 125/O772P se haya liberado como CA 125/O772P desprendido. En particular, la presencia de CA 125/O772P asociado a células se demuestra a través de la generación y caracterización exitosas de varios anticuerpos que se unen de manera preferente a las especies de CA 125/O772P asociadas a células con respecto a las especies de CA 125/O772P desprendidas. Además de la unión preferente, los resultados presentados en este documento describen anticuerpos que presentan un alto grado de especificidad para el CA 125/O772P y afinidad para el antígeno de CA 125/O772P asociado a células. Asimismo, los resultados presentados en este documento demuestran que dichos anticuerpos pueden funcionar para mediar la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P.

25 6.1. Generación de anticuerpos

Los experimentos proporcionados en el presente documento describen la generación de anticuerpos monoclonales contra una porción extracelular de CA 125/O772P. Como se demuestra en subsecciones posteriores, los anticuerpos generados a través de dichas técnicas incluyen aquellos que son específicos para el CA 125/O772P, que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, que presentan un alto grado de afinidad para CA 125/O772P asociado a células, y que pueden funcionar para mediar la lisis de células tumorales positivas para CA 125/O772P.

35 Construcciones de antígenos y de expresión de antígenos:

Se generaron construcciones de expresión para expresar el antígeno CA 125/O772P para su uso en la producción de anticuerpos. El primer antígeno a expresar, designado 3 repeticiones de O772P (FIG. 1; SEQ ID NO:1), incluía las tres repeticiones en tándem más carboxílicas del dominio extracelular de CA 125/O772P, hasta la secuencia transmembrana del CA 125/O772P, aunque sin incluir esta última. El segundo antígeno a expresar, designado 3 repeticiones TM de O772P (FIG. 2; SEQ ID NO:2), incluía las tres repeticiones en tándem más carboxílicas del dominio extracelular de CA 125/O772P así como la secuencia transmembrana y citoplásmica representada en la FIG. 2. En particular, se subclonaron secuencias que codificaban cada uno de los antígenos en vectores pSecTag2B (Invitrogen). El vector codifica una secuencia señal de Ig kappa para la secreción y etiquetas myc y 6xhis para la detección y purificación de la proteína expresada.

45

Expresión de antígenos:

Se produjo un antígeno recombinante transfectando transitoriamente células CHO-K1 en suspensión con las construcciones antes descritas. Los medios usados para la transfección fueron ProCHO CDM (BioWhittaker Inc. Walkersville, MD) con complementos de GS (JRH Biosciences Lenexa, KS). Para producir un litro de material, se rehidrataron 2 mg del reactivo de transfección Clonfection™ (Clontech, Palo Alto, Ca), los mismos se diluyeron en 24 ml de medios de transfección y se incubaron durante 15 minutos con 125 µg de ADN en los mismos medios. La mezcla de transfección se añadió a 450 ml de medios de transfección que contenían $1,25 \times 10^9$ células CHO-K1 en suspensión y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en un agitador orbital. Tras la incubación, a las células transfectadas se adicionaron 500 ml de ProCHO 4-CDM con complementos de GS, penicilina-estreptomina y FBS con nivel ultrabajo de IgG al 10 % (Life Technologies Rockville, MD), y el cultivo se transfirió a botellas rotatorias. El día 3 se recogieron muestras y los cultivos se recolectaron el día 7.

Purificación de antígenos:

60

Se concentró sobrenadante de transfección en 250 ml usando un sistema Millipores Pellicon con una membrana con un valor de corte de 50 K. Se transfirieron 2 ml de resina Talon (Clontech, Palo Alto, CA), obtenida a partir del kit de Purificación TALON (cat n.º K1253-1), a una columna de 2 ml y se lavó con 20 ml de 1 x tampón de lavado/extracción (suministrado con el kit, pH 7,0). A continuación, la muestra concentrada se cargó en la columna con un caudal de 1 ml/minuto. La columna se lavó entonces con 15 ml de tampón de extracción/lavado. A continuación, la proteína unida se eluyó con 4 x 1 ml de tampón de elución (fosfato de Na 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 150 mM, pH 7,0). Se recogió medio ml de fracciones y el mismo se analizó mediante SDS-PAGE y se visualizó usando Azul Brillante de Coomassie G-250. Las fracciones que contenían proteína recombinante de 3 repeticiones de 0772P se purificaron adicionalmente por cromatografía con Con-A Sepharose. Un ml de Con-A Sepharose (Vector Laboratories, Inc., cat n.º AC-1003, lot n.º K0425) se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml y se lavó con 10 ml de 1 x solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2. El tampón de lavado se eliminó por centrifugación. Las fracciones de la purificación TALON que contenían proteína de 3 repeticiones de 0772P se diluyeron 1: 1 con 1 x PBS, pH 7,2 y se añadieron a ConA Sepharose lavada y se sometieron a rotación durante una noche a 4 °C. A continuación, la suspensión de resina se transfirió a una columna de flujo de gravedad de 5 ml y se lavó con 10 ml de 1x PBS, pH 7,2. Se eluyeron muestras con metil α -D-mannopiranosido 0,6 M en 1 x PBS, pH 7,2 en 0,5 ml de fracciones en un volumen total de 6 ml. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y se visualizaron usando Azul Brillante de Coomassie G-250. Las fracciones que contenían proteína de 3 repeticiones de 0772P pura se combinaron y se dializaron contra 2 l de 1 x PBS, pH 7,2 y se almacenaron a 4 °C.

20 Inmunización:

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

30

Producción de hibridomas:

Se extrajo el bazo de los ratones y se recolectaron células del bazo troceando con pinzas y cribando las células a través de un tamiz. Las células se lavaron dos veces en medio IMDM y se realizaron recuentos celulares. Se recolectaron células de mieloma de ratón P3X63Ag8.653 (ATCC CRL-1580) en crecimiento de fase logarítmica, las mismas se lavaron dos veces en medio IMDM y se realizó un recuento de las células. Se mezclaron entre sí células del bazo y células de mieloma en una relación de 5: 1 y se centrifugaron a 200 x g durante 5 minutos. Después de la aspiración, el sedimento se soltó dando golpes en el fondo del tubo. Se añadió un ml de una solución al 50 % de PEG (p. m. 1450) gota a gota durante un periodo de 30 segundos y a continuación el sedimento se mezcló suavemente durante 30 segundos usando una pipeta. La suspensión resultante se dejó en reposo sin perturbaciones durante 30 segundos más. Se añadieron 5 ml de IMDM durante un periodo de 90 segundos seguidos inmediatamente por otros 5 ml. La suspensión celular resultante se dejó sin perturbaciones durante 5 minutos. Tras la centrifugación, las células se resuspendieron en medio HAT (IMDM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol al 0,6 % (solución al 0,04 %), hipoxantina, aminopterina, tímida, y Factor de Clonación para Hibridomas ORIGENO al 10 % (IGEN International, Gaithersburg, MD)) a una concentración de 5×10^5 células por ml y se sembraron en placas de 96 pocillos a 0,2 ml o 1×10^5 células por pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 7 % con humedad del 100 %. Siete días después de la fusión, los medios se extrajeron y se sustituyeron por IMDM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, solución madre de 2-mercaptoetanol al 0,6 % (0,04 %), hipoxantina y timidina. De diez a catorce días después de la fusión, el sobrenadante se sacó de los pocillos con colonias de hibridomas en crecimiento y se sometió a prueba en relación con la unión a CA 125/0772P, como se analiza en el presente documento.

Purificación de anticuerpos de sobrenadantes de hibridomas:

Una columna desechable de 5 ml (Bio-Rad, Hercules, CA) se rellenó con medio ml de resina de proteína G (Sigma, St. Louis, MO). La columna se equilibró previamente con 20 ml de tampón de unión (PBS 20 mM, pH 7,0). El sobrenadante de hibridoma se cargó en la columna a un caudal menor de 0,5 ml/minuto. A continuación, la columna se lavó con 20 ml de tampón de unión a un caudal de 1 ml/minuto. Como alternativa, se usaron columnas de Proteína G prerellenadas (Amersham Pharmacia Biotech). A continuación, el anticuerpo se eluyó con 3 ml de tampón de elución (glicina 0,1 M, pH 2,7). Se recogieron fracciones de 0,5 ml en tubos de 1 ml que contenían 50 μ l

60

de Tris 1 M, pH 9,0. Se dializaron muestras contra PBS (0,5 l) y las mismas se concentraron a aproximadamente 1 mg/ml de proteína.

Concentraciones de anticuerpos en sobrenadantes de hibridomas:

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

6.2. Especificidad de CA 125/O772P

- 20 Los resultados presentados en este documento demuestran que la producción de anticuerpos a través de las técnicas antes descritas dieron como resultado la generación de anticuerpos específicos para el CA 125/O772P.

Ensayo de especificidad ELISA

25 Métodos:

- Se incubaron placas de noventa y seis pocillos y las mismas se recubrieron con 100 µl (por pocillo) de 1 µg/ml de proteína de 3 repeticiones de O772P (SEQ ID NO:1) (purificada por afinidad) en tampón de bicarbonato (0,2 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,6, Sigma) durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con 200 µl de 1 x
 30 PBST (1 x solución salina tamponada con fosfato (PBS), Tween 20 al 0,05 %) tres veces y se bloquearon con 100 µl de 1 x PBST que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar las placas con 1 x PBST tres veces, a las mismas (pocillos individuales) se les añadieron anticuerpos producidos por hibridomas seleccionados anti-CA 125/O772P murinos (0,04 mg/µl). Después de 1 hora de incubación a 37 °C, las
 35 placas se lavaron con 1 x PBST tres veces. Para la detección de señales, a cada pocillo se le añadieron 100 µl de IgG anti-ratón de oveja, conjugada con HRP (peroxidasa de rábano picante) (dilución 1:2000 en 1 x PBST + BSA al 1 %; Amersham Biosciences), y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron de nuevo tres veces con 1 x PBST. Finalmente, en cada pocillo se añadieron 100 µl de una mezcla de sustrato de TMB (3, 3',5, 5'-tetrametilbencidina) y H₂O₂ (relación 1: 1, KPL Kirkguard Perry Laboratories), y, después de una incubación de 5
 40 minutos, se midió la absorbancia a 405 nm con un lector de placas (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). El ensayo se realizó por triplicado para cada anticuerpo producido por el hibridoma O772P seleccionado y se recogieron y analizaron datos en forma de un ensayo cinético, medido durante un periodo de tiempo de 5 minutos. Se calcularon y presentaron valores promedio. En cada experimento, se incluyeron también controles para reactivos blancos e individuales.

45 Resultados:

- La siguiente tabla 7 presenta los resultados del Ensayo de Especificidad ELISA para cuatro anticuerpos producidos por hibridoma anti-CA 125/O772P seleccionados (117.1, 368.1, 501.1, 776.1). La tabla muestra también los
 50 resultados del Ensayo de Especificidad ELISA para dos anticuerpos CA 125/O772P disponibles comercialmente (OC125 y M11, Dako Corp., Carpinteria, CA). Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo en este ensayo (es decir, es específico para el CA 125/O772P) si presenta una absorbancia de entre al menos 5 y más de 30 DO/microgramo de anticuerpo. Estos resultados demuestran que cada uno de los anticuerpos sometidos a prueba es específico para el CA 125/O772P. Se observa, como se demuestra a continuación, que, aunque el OC125 y el M11 se consideran específicos para el CA 125/O772P, ninguno de los
 55 anticuerpos se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células con respecto al CA 125/O772P desprendido. SD = desviación típica.

TABLA 7

Nombre del anticuerpo	absorbancia (DO)	SD	absorbancia (DO)/µg
OC 125	0,73	0,003	18
M11	0,974	0,008	24

117.1	0,619	0,033	15
368.1	1,293	0,004	32
501.1	0,856	0,005	21
776.1	1,178	0,043	29

Los resultados de la Tabla 8 a continuación muestran datos de absorbancia para veinte anticuerpos adicionales generados usando las técnicas descritas anteriormente. Como se muestra mediante los datos de absorbancia, cada uno de estos anticuerpos es también específico para el CA 125/O772P.

5

TABLA 8

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

Ensayo de especificidad por citometría de flujo:

10 **Método:**

Se extrajeron células (OVCAR-3 (Acceso ATCC N.º HTB-161), SK-OV3 (Acceso ATCC N.º HTB-77), NIH/3T3 (Acceso ATCC N.º CRL-1658), y células NIH/3T3 transfectadas con una secuencia que expresa la proteína de 3 repeticiones de 0772P (SEQ ID NO:2)) de placas de cultivo por digestión con tripsina (0,25 %). Las células se contaron y se valoró la viabilidad mediante exclusión con azul de tripano (0,2 %). A continuación, las células se centrifugaron (500 x g, 5 minutos) y se resuspendieron en tampón de FACS (1 x DPBS que contenía BSA al 1 % y azida sódica al 0,1 %) a una concentración de $5-10 \times 10^7$ células/ml. A continuación, las células se distribuyeron a un volumen de 100 μl /pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se centrifugaron a 500 x g durante 3 minutos. El sobrenadante de anticuerpos se extrajo por aspiración, y los sobrenadantes de hibridomas de 50 μl se diluyeron a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en tampón de FACS y se añadieron a cada pocillo que contenía células. Como control negativo, se incluyó IgG1 kappa murina (Sigma, St. Louis, MO) (en una de las siguientes opciones: 2,0, 1,0, 0,5, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y como controles positivos se incluyeron OC125 y M11 (DAKO Corp., Carpinteria, CA). Las placas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con balanceo. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con tampón de FACS (200 μl /pocillo), siguiendo a cada lavado una centrifugación y una aspiración del tampón. Se diluyó biotina-IgG de cabra anti-ratón (Fe) (Sigma, St. Louis, MO) 1: 1000 en tampón de FACS, y se añadieron 50 μl a cada pocillo que contenía células. Se incubaron placas durante 30 minutos a 4 °C con balanceo. A continuación, las células se lavaron con tampón de FACS, como se describió antes. Se diluyó estreptavidina-Alexa-Four 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) 1:1000 en tampón de FACS y se añadieron 50 μl a cada pocillo que contenía células. A continuación, las placas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con lavado. Luego, las células se lavaron con tampón de FACS, como se describió antes. A continuación, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de FACS y se transfirieron a tubos Falcon 2052 y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur de Becton-Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, CA).

Resultados:

La siguiente tabla 9 presenta los resultados del Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo de cuatro anticuerpos producidos por hibridoma anti-CA 125/O772P seleccionados (117.1, 368.1, 501.1, 776.1). La tabla muestra también los resultados del Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo para el OC125 y el M11 5 disponibles comercialmente. Las células NIH/3T3 y las células SK-OV3 (una línea celular de cáncer de ovario) se consideraron controles negativos, ya que ninguna produce CA 125/O772P.

Los anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo de unión a antígenos) se consideran positivos (es decir, son específicos para el CA 125/O772P) si presentan un resultado del Ensayo de Especificidad por Citometría de Flujo 10 dentro de los siguientes intervalos de células positivas: menos de aproximadamente el 5 % de células NIH/3T3 positivas, y al menos aproximadamente el 60 % de células NIH/3T3 positivas que producen el polipéptido de SEQ ID NO:2; o menos de aproximadamente el 25 % de células SK-OV3 positivas y al menos aproximadamente el 80 % de células OVCAR-3 positivas. (nd - no determinado)

15 Estos resultados demuestran que cada uno de los anticuerpos sometidos a prueba es específico para el CA 125/O772P. Se observa, como se demuestra a continuación, que, aunque el OC125 y el M11 se consideran específicos para el CA 125/O772P, ninguno de estos dos anticuerpos se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células con respecto al CA 125/O772P desprendido.

20

TABLA 9

% positivo de anticuerpos	% positivo - 3 repeticiones de NIH/3T3 O772P	% positivo - NIH/3T3	% positivo - OVCAR-3	% positivo - SK-OV3
OC 125 (1 µg/ml)	nd	nd	98	16
OC 125 (0,1 µl/ml)	nd	nd	85	10
M11 (1 µg/ml)	84	0,1	98	17
M11 (0,1 µg/ml)	nd	nd	91	11
117.1 (2 µg/ml)	83	0,1	93	6
117.1 (0,5 µg/ml)	63	0	nd	nd
386.1 (0,1 µg/ml)	86	0,2	89	5
386.1 (2 µg/ml)	75	0,2	nd	nd
501.1 (0,5 µg/ml)	89	0	95	5
501.1 (2 µg/ml)	85	0,2	nd	nd
776.1 (0,5 µg/ml)	86	0	94	9
776.1 (0,1 µg/ml)	84	0	nd	nd

Los resultados proporcionados en la siguiente Tabla 10 presentan datos de OVCAR-3/SK-OV3 para veinte anticuerpos adicionales generados como se ha descrito anteriormente, que demuestran que estos anticuerpos son también específicos para el CA 125/O772P.

25

TABLA 10

Nombre del anticuerpo	% positivo - OVCAR-3 (0,5 µg/ml)	% positivo - SK-OV3 (2,0 µg/ml)
325.1	98	6
446.1	94	5
621.1	97	9
633.1	89	9
654.1	86	8
725.1	96	10
8G9	97	4
7F10	96	3
8A1	97	3
8C3	97	3
15C9	95	3
8E3	95	1
8B5	94	1
7G10	96	2

16C7	96	3
7C6	96	3
7H1	96	0
16H9	96	3
7A11	94	1
4E7	97	2

6.3. Los ensayos de competición demuestran la producción exitosa de anticuerpos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P

- 5 Los resultados presentados en el presente documento demuestran que los anticuerpos producidos a través de las técnicas antes descritas pueden generar anticuerpos que se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células con respecto al CA 125/O772P desprendido. El hecho de que dichos anticuerpos se puedan generar demuestra también, por primera vez, que existen polipéptidos CA 125/O772P asociados a células, es decir, que una porción extracelular de CA 125/O772P permanece en una forma asociada a células, aunque sea de forma
- 10 transitoria, después de que se haya liberado una porción del polipéptido CA 125/O772P como CA 125/O772P desprendido.

Ensayo de competición ELISA:

15 Método:

Se recubrieron placas de noventa y seis pocillos con 100 µl (por pocillo) de 1 µg/ml de polipéptido de 3 repeticiones de O772P (SEQ ID NO:1) (purificado por afinidad) en tampón de bicarbonato (0,2 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.6, Sigma) durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con 200 µl x PBST (1 x solución salina

20 tamponada con fosfato (PBS), Tween 20 al 0,05 %) tres veces y se bloquearon con 100 µl de 1 x PBST que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % durante 2 horas a 37 °C. Después de un lavado con 1 x PBST tres veces, se añadieron anticuerpos producidos por hibridomas anti-CA 125/O772 seleccionados con concentraciones indicadas (por ejemplo, 0,04 µg/ml) a pocillos que se habían preincubado durante entre 20 y 30 minutos con cantidades en exceso (por ejemplo, entre 10 y 50 veces p/p) de CA 125/O772P desprendido (Fitzgerald Industries International,

25 Concord, MA; Scripps Laboratories, La Jolla, CA; y/o United States Biological Corp.). Después de 1 hora de incubación a 37 °C, las placas se lavaron con 1 x PBST tres veces. Para la detección de señales, a cada pocillo se le añadieron 100 µl de IgG de oveja anti-ratón conjugada con HRP (dilución 1:2000 en 1 x PBST + BSA al 1 %, Amersham Biosciences) y los mismos se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente con 1 x PBST tres veces. Finalmente, a cada pocillo se añadieron 100 µl de una mezcla de sustrato de TMB y

30 H₂O₂ (relación 1: 1, KPL), y se midió la absorbancia a 405 nm con un lector de placas (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA). El ensayo se realizó por triplicado para cada anticuerpo seleccionado, y se calcularon y presentaron valores promedio. Se calculó el porcentaje de inhibición en comparación con la ausencia de competición, para anticuerpos individuales basándose en valores promedio. En cada experimento se incluyeron también controles para reactivos blancos e individuales.

35

Resultados:

La siguiente tabla 11 presenta los resultados del Ensayo de Competición ELISA para cuatro anticuerpos producidos por hibridoma anti-CA 125/O772P seleccionados (117.1, 368.1, 501.1, 776.1). La tabla muestra también los

40 resultados del Ensayo de Competición ELISA para el anticuerpo CA 125/O772P disponible comercialmente (OC125; DAKO Corp., Carpintería, CA). Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo en este ensayo (es decir, se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células) si presenta menos de aproximadamente el 25 % de inhibición de unión con un exceso de 25 veces (p/p) de CA 125/O772P desprendido. Estos resultados demuestran que cada uno de los anticuerpos 117.1, 368.1, 501.1 y 776.1 se unen de manera

45 preferente a CA 125/O772P asociado a células. Estos resultados demuestran también que el anticuerpo OC125 no consigue unirse de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células. (SD - desviación típica)

TABLA 11

anticuerpo	absorbancia	SD	absorbancia con competidor de CA 125/O772P desprendido (exceso de 25 veces p/p)	SD	porcentaje de inhibición de unión	absorbancia con competidor de 3 repeticiones de O772P (exceso de 10 veces p/p)	SD	porcentaje de inhibición de unión
OC 125	0,73	0,003	0,074	0,001	95	0,047	0,002	99
117.1	0,619	0,033	0,554	0,007	11	0,071	0,001	94
368.1	1,293	0,004	1,333	0,009	0	0,915	0,016	30
501.1	0,856	0,005	0,735	0,008	15	0,065	0,002	96
776.1	1,178	0,043	0,977	0,01	17	0,077	0,001	96

Los resultados presentados en la Tabla 12 a continuación presentan datos del competidor de CA 125/O772P para veinte anticuerpos adicionales generados a través de las técnicas antes descritas, que demuestran que estos 5 anticuerpos también representan anticuerpos que se unen de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células.

TABLA 12

Nombre del anticuerpo	% de inh. de unión con competidor de CA 125/O772P desprendido (exceso de 25 veces)
325.1	2
446.1	7
621.1	2
633.1	7
654.1	9
725.1	7
8G9	7
7F10	6
8A1	8
8C3	5
15C9	5
8E3	4
8B5	6
7G10	3
16C7	3
7C6	2
7H1	4
16H9	0
7A11	5
4E7	7

10 **Ensayo de competición por citometría de flujo:**

Método:

Se extrajeron células NIH:OVCAR-3 (Acceso ATCC N.º HTB-161) de placas de cultivo por digestión con tripsina (0,25 %). A continuación, se contaron las células y se valoró la viabilidad mediante exclusión con azul de tripano (0,2 %). A continuación las células se centrifugaron (500 x g, 5 minutos) y se resuspendieron en tampón de FACS (1 x DPBS que contenía BSA al 1 % y azida sódica al 0,1 %) a una concentración de 5-10 x 10⁷ células/ml. A continuación, las células se distribuyeron (100 µl/pocillo) en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se centrifugaron a 500 x g durante 3 minutos. Los sobrenadantes se eliminaron por aspiración. Los sobrenadantes de hibridomas se diluyeron a 0,2 µg/ml de anticuerpo en tampón de FACS. El CA 125 (Fitzgerald Industries International, Concord, MA) se diluyó a 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 200 µg/ml, 60 µg/ml, 20 µg/ml, 6 µg/ml o 2 µg/ml en tampón de FACS. Se incubaron treinta µl de solución de anticuerpo con 30 µl de CA 125 diluido o tampón en solitario durante 30 minutos a 4 °C. A cada pocillo que contenía células se le añadieron 50 µl de la mezcla. Se incluyeron IgG1 kappa murina (Sigma, St. Louis, MO) y M11 (DAKO Corp., Carpinteria, CA), respectivamente, como controles negativo y positivo. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con balanceo. Posteriormente, las células se lavaron 2

veces con tampón de FACS (200 µl/pocillo), siguiendo a cada lavado una centrifugación y aspiración de tampón. Se diluyó biotina-IgG de cabra anti-ratón (Fe) (Sigma, St. Louis, MO) 1: 1000 en tampón de FACS, y se añadieron 50 µl a cada pocillo que contenía células. Se incubaron placas durante 30 min a 4 °C con balanceo. Luego, las células se lavaron con tampón de FACS, como se describió antes. Se diluyó estreptavidina-Alexa-Flúor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) 1: 1000 en tampón de FACS, y se añadieron 50 µl a cada pocillo que contenía células. A continuación, las placas se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con lavado. A continuación, las células se lavaron con tampón de FACS, como se describió antes. A continuación, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de FACS y se transfirieron a tubos Falcon 2052 y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur de Becton-Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, CA). Se representó el porcentaje de células positivas en función de la concentración de CA 125/O772P usando un software de representación GraphPad. Usando un análisis de regresión lineal, se realizaron determinaciones de CI_{50} , expresada como la concentración de CA 125/O772P desprendido en la que se observa el 50 % de inhibición de la unión.

Resultados:

La FIG. 3 muestra una gráfica representativa de la concentración de CA 125/O772P desprendido con respecto al porcentaje de células positivas para, en este caso, el anticuerpo 117.1 y el anticuerpo M11 de control (cuadrados). La Tabla 13 a continuación presenta un resumen de los resultados del Ensayo de Competición por Citometría de Flujo. Un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos) se considera positivo (es decir, se considera que se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células) si presenta una CI_{50} , según se mide mediante el porcentaje de células positivas, de al menos aproximadamente 0,05 mg/ml de CA 125/O772P desprendido.

Los resultados mostrados en la Tabla 13 a continuación demuestran que cada uno de los anticuerpos 117.1, 501.1, 776.1, 8C3, 16H9, 325.1, 633.1 y 725.1 se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células. Se observa que los resultados de la Tabla 13 demuestran también que los anticuerpos OC125 y M11 no se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células.

TABLA 13

anticuerpo	CI_{50} (mg/ml de CA 125) función del % de células positivas
OC 125	0,005
M11	0,01
117,1	>1,0
368.1	nd
501.1	0,13
776.1	0,19
8C3	>0,5
16H9	>0,5
325.1	0,36
621.1	>0,5
633.1	0,18
725.1	0,42
446.1	nd
654.1	nd
8G9	nd
7F10	nd
8A1	nd
15C9	nd
8E3	nd
8B5	nd
7G10	nd
16C7	nd
7C6	nd
7H1	nd
7A11	nd

30 6.4. Afinidad

Los resultados presentados en este documento demuestran que entre los anticuerpos generados que se unen de

manera preferente al CA 125/O772P, se encuentran anticuerpos que presentan un alto grado de afinidad para CA 125/O772P asociado a células.

Ensayo de afinidad BIAcore: Métodos:

5 Se acopló un chip biosensor BIAcore GM5 al instrumento BIAcore x y se activó con 55 µl de NHS/EDC 1: 1 a temperatura ambiente. La proteína de la región de 3 repeticiones de 0772P y BSA a 10 µg/ml en tampón acetato 0,05 M, pH 4,5, se inmovilizaron en la célula de flujo (FC) 1 y FC2 del chip activado, respectivamente, con un caudal de 5 µl/minuto para lograr una respuesta de resonancia de entre 1000 y 2000 RD. A continuación, el chip se bloqueó
10 por inyección de 55 µl de etanolamina-HCl, pH 8,5, y la siguió un lavado 5 veces con NaOH 50 mM-NaCl 1 M. Para medir la unión de anticuerpos monoclonales anti-0772P a la región de 3 repeticiones de 0772P inmovilizada en el chip, sobre la superficie del sensor, a un caudal de 5 µl/minuto, se inyectaron 30 µl de anticuerpos monoclonales anti-0772P con concentraciones variables en tampón de desplazamiento BIAcore (HBS-EP, Cat. n.º 1001-080, BIAcore, Piscataway, NJ). Tras finalizar la fase de inyección, se monitorizó la disociación en tampón de
15 desplazamiento BIAcore con el mismo caudal durante 360 segundos. La superficie se regeneró entre inyecciones usando 30 µl de NaOH 50 mM-NaCl 1 M. Se analizaron los sensogramas individuales usando BIAevaluation.

Ensayo de afinidad BIAcore: Resultados:

20 La Tabla 14 a continuación presenta un resumen de los resultados del Ensayo de Afinidad BIAcore para los anticuerpos 117.1, 368.1, 501.1 y 776.1, así como para los anticuerpos M11 y OC125. Como se muestra en la tabla, cada uno de los anticuerpos 117.1, 368.1, 501.1, 776.1, 4E7, 7C6, 7F10, 7G10, 7H1, 8A1, 8B5, 8C3, 8E3, 15C9, 16C7, 16H9, 325.1, 621.1, 633.1 y 725.1 se une con una alta afinidad al polipéptido CA 125/O772P.

25

TABLA 14

anticuerpo	K _d (nM)
M11	1,6
OC125	4
117.1	12
368.1	0,7
501.1	70
776.1	0,4
4E7	30
7A11	nd
7C6	73
7F10	3,7
7G10	47
7H1	69
8A1	2,8
8B5	32
8C3	5,0
8E3	33
8G9	14
15C9	14
16C7	44
16H9	3,9
325.1	15
446.1	nd
621.1	40
633.1	26
654.1	190
725.1	2,6

6.5. Ensayos funcionales:

30 Los resultados presentados en este documento demuestran que entre los anticuerpos generados que se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células se encuentran anticuerpos que pueden funcionar para mediar la lisis de células tumorales positivas para el CA 125/O772P.

Ensayo de ADCC:**Método:**

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

20 Resultados:

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

25

Ensayo de CDC:

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

40 6.6. Secuencias de anticuerpos que se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células

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

45

Métodos:

Se recolectaron y sedimentaron células de hibridoma a 1800 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se añadió un ml de TRIzol (Invitrogen) por cada 10⁷ células y se procesó el ARN total. Se añadieron doscientos μ l de cloroformo por 1
 50 ml de Reactivo de TRIzol, los mismos se agitaron vigorosamente a mano durante 15 segundos y se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa que contenía el ARN se transfirió a un tubo limpio y se precipitó adicionando 500 μ l de alcohol isopropílico por 1 ml de Reactivo de TRIzol usado para la homogeneización inicial. El sedimento de ARN se lavó una vez con EtOH al 70 % y se secó al aire brevemente antes de ser resuspendido en agua-DEPC. Tres f-tg de ARN total se trataron con 10 unidades de fosfatasa intestinal de ternera
 55 (CIP) durante 1 hora a 50 °C para eliminar los fosfatos en 5'. Esta etapa eliminó el ARNm truncado y el ARN no mensajero de las etapas posteriores. El ARN desfosforilado se trató con 0,5 unidades de pirofosfatasa ácida del tabaco (TAP) durante 1 hora a 37 °C para eliminar la estructura protectora 5' de ARNm de longitud completa intacto. El Oligo ARN de GeneRacer (5'CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3'; SEQ ID NO:43) se ligó al extremo 5' del ARNm usando 5 unidades de ARN Ligasa de T4 durante 1 hora a 37 °C. El ARNm
 60 ligado se sometió a transcripción inversa usando 5 unidades de Transcriptasa inversa de AMV y el Cebador Oligo dT

de GeneRacer (5'GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₁₈-3'; SEQ ID NO:44) durante 1 hora a 42 °C para crear ADNc con sitios de cebado conocidos en los extremos 5' y 3'. Los extremos 5 se amplificaron usando un cebador 3 específico del gen, situado en la región constante del gen deseado (cadena pesada 5' - AYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC (SEQ ID NO:45), cadena ligera 5'-GGATACAGTTGGTGCAGCATC-5' (SEQ ID NO:46)) y el Cebador 5 de GeneRacer homólogo al Oligo ARN de GeneRacer (5'CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'; SEQ ID NO:47). La reacción de PCR se llevó a cabo usando 2 µl de ADNc desnaturalizando el molde a 94 °C durante 5 minutos y, a continuación, desnaturalizando a 94 °C durante 30 s, alineando a 55 °C durante 30 s, aplicando elongación a 72 °C durante 1 minuto durante 30 ciclos y aplicando elongación durante un ciclo final a 72 °C durante 7 minutos en un Sistema de PCR GeneAmp 9700. Las bandas de interés se purificaron con gel usando el Kit de Purificación con Gel Qiagen y se clonaron usando el Kit de Clonación TOPO-4 (Invitrogen). Las colonias aisladas resultantes se cribaron por PCR para el inserto de tamaño correcto en una máquina GeneAmp 9700. La PCR se realizó lisando las bacterias a 94 °C durante 8 minutos, a continuación desnaturalizando a 94 °C durante 30 segundos, alineando a 55 °C durante 30 segundos, aplicando elongación a 72 °C durante entre 1 y 4 minutos durante 25 ciclos y aplicando elongación durante un ciclo final a 72 °C durante 7 minutos. Los cebadores usados para el cribado fueron: sentido, 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3' (SEQ ID NO:48) o 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO:49), cebadores de región constante de cadena pesada o ligera antisentido (véase anteriormente). Se dejaron crecer clones positivos en un cultivo durante una noche, de 4 ml, para amplificar el clon y se realizó una Miniprep SNAP (Invitrogen). A continuación, los clones se secuenciaron usando las aplicaciones químicas BigDye (Perkin Elmer) en un Sistema de PCR GeneAmp 9700 durante 25 ciclos desnaturalizando el ADN durante 10 s a 94 °C, hibridando el cebador (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3' (SEQ ID NO:50) o 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO:51)) a 50 °C durante 5 s y aplicando elongación del cebador durante 4 minutos a 72 °C. A continuación, las reacciones se pasaron a una Columna DyeEx (Qiagen) y se secuenciaron en un secuenciador de ADN automatizado Applied Biosystems 310.

25 **Resultados:**

Se obtuvieron secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones variables de seis anticuerpos monoclonales que se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células, y las mismas se representan en las FIGS. 5-10. En particular, las FIGS. 5A, 6A, 7A, 8A, 9A y 10A representan las secuencias nucleotídicas que codifican las regiones de cadena ligera variable de los anticuerpos monoclonales 117.1, 368.1, 501.1, 776.1, 725.1 y 16H9, respectivamente, mientras que las FIGS. 5B, 6B, 7B, 8B, 9B, y 10B representan las secuencias nucleotídicas que codifican las regiones de cadena pesada variable de los anticuerpos monoclonales 117.1, 368.1, 501.1, 776.1, 725.1 y 16H9, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias líder tienen un doble subrayado y las secuencias nucleotídicas que codifican secuencias de CDR tienen un subrayado.

Se obtuvieron secuencias de aminoácidos de las regiones variables de seis anticuerpos monoclonales que se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células, y las mismas se representan en las FIGS. 5-10. En particular, las FIGS. 5C, 6C, 7C, 8C, 9C y 10C representan las secuencias de aminoácidos de las regiones de cadena ligera variable de los anticuerpos monoclonales 117.1, 268.1, 501.1, 776.1, 725.1 y 16H9, respectivamente, mientras que las FIGS. 5D, 6D, 7D, 8D, 9D y 10D representan las secuencias de aminoácidos de regiones de cadena pesada variable de los anticuerpos monoclonales 117.1, 368.1, 501.1, 776.1, 725.1 y 16H9, respectivamente. Las secuencias líderes tienen un doble subrayado, y las secuencias CDR tienen un subrayado. Se observa que las secuencias líderes no se convierten en parte de los anticuerpos maduros, y, como tales, no se consideran parte de las regiones variables de los anticuerpos.

45 **6,7. Análisis western blot de sobrenadantes de OVCAR-3**

El ejemplo práctico presentado en el presente documento proporciona un análisis western blot diseñado para someter a prueba directa la capacidad de los anticuerpos 368.1 o 776.1 de unirse al CA 125/O772P desprendido. Los datos presentados en el presente documento demuestran directamente que ni el anticuerpo 368.1 ni el 776.1 reconocen las especies de alto peso molecular correspondientes al CA 125/O772P desprendido. Por el contrario, los anticuerpos OC 125 y M11 sí reconocieron esta especie de alto peso molecular, mientras que la totalidad de los anticuerpos sometidos a prueba se une fuertemente al polipéptido 0772P recombinante que contenía 3 repeticiones de control. Por lo tanto, estos datos proporcionan una confirmación adicional de que los anticuerpos 368.1 y 776.1 se unen de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células.

Métodos:

Los medios (RPMI complementado con suero bovino fetal al 10 %) de células OVCAR-3 cultivadas se extrajeron y se sustituyeron por medios complementados nuevos. Se extrajeron alícuotas de medios condicionados 1 hora, 6

horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas después. Se usaron medios complementados como el punto cronológico 0.

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

Se transfirieron proteínas a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 30 voltios y, a continuación, se bloquearon durante una noche en leche desnatada a 4 °C. Se llevaron anticuerpos primarios hasta 400 µg/ml en PBS y, a continuación, se diluyeron 1:1.000 en leche desnatada (OC125 Dako n.º M3519, M11 Dako n.º M3520).
 10 Las transferencias se lavaron en PBS/Tween tres veces durante 10 minutos. El anticuerpo secundario (IgG anti-ratón, específico para Fe, Sigma n.º B-7410) se diluyó 1: 1000 en leche desnatada y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron lavados como se describió antes. Se diluyó neutraAvidin-HRP (Molecular Probes n.º A-2664) 1:1000 en PBS/Tween y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las transferencias se lavaron en un volumen grande de PBS/Tween y se visualizaron por quimioluminiscencia
 15 (exposición de 30 s).

Resultados:

Para determinar si el anticuerpo 368.1 o 776.1 se une al polipéptido CA 125/O772P desprendido, se realizó un análisis western blot sobre el sobrenadante de células OVCAR-3 cultivadas, de las que se sabe que desprenden CA 125/O772P de su superficie. Tal análisis somete a prueba la capacidad de los anticuerpos de unirse a CA 125/O772P desprendido de manera directa.
 20

Como se indica en la FIG. 11, los resultados del análisis western demuestran que ni el anticuerpo 368.1 ni el 776.1 reconocen la especie de alto peso molecular que se corresponde con el CA 125/O772P desprendido. Por el contrario, los anticuerpos M11 y OC 125, es decir, anticuerpos que no se unen de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células, sí que reconocieron esta especie de alto peso molecular. La totalidad de los cuatro anticuerpos sometidos a prueba se unen fuertemente al polipéptido 0772P recombinante que contiene 3 repeticiones de control, 3 repeticiones de 0772P, el cual contiene secuencias de dominio extracelular que son inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana del CA 125/O772P. Por lo tanto, estos datos proporcionan una confirmación adicional de que los anticuerpos 368.1 y 776.1 se unen de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células.
 25
 30

6.8. El anticuerpo 776.1 radiomarcado ralentiza el crecimiento tumoral

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

Métodos:

40

Animales

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

45

Implantación de células tumorales

Para los estudios de eficacia, se usó la línea celular de carcinoma de ovario humano OVCAR-3 para el modelo de cáncer de ovario de humano. La línea OVCAR-3 (Hamilton, et al., Cancer Res. 43:5379-5389 (1983)) se obtuvo a partir de un adenocarcinoma de ovario de origen humano y se compró en ATCC (Catálogo n.º HTB-161). Las células OVCAR-3 se mantuvieron en RPMI-1640 complementado con FBS al 10 % a 37 °C en CO2 al 5 %. El OVCAR-3 expresa el CA 125/O772P asociado a tumor sobre la superficie celular. Se implantaron subcutáneamente semiinjertos de OVCAR-3 y los mismos se dejaron crecer como tumores ectópicos en ratones lampiños NCr inmunodeficientes. El criterio principal para el crecimiento tumoral de OVCAR-3 subcutáneo fue lograr tumores de 50
 55 150-250 mm³ antes de dos semanas tras la implantación, momento en el cual comenzaría la terapia experimental.

Para facilitar la formación subcutánea del tumor, la línea OVCAR-3 se propagó en serie *in vivo* dentro de las cavidades peritoneales de ratones nu/nu NCr (Burbridge et al., Int. J. Oncol.li: 1155-1162 (1999); Guichard et al., Clin. Cancer Res. 2: 3222-3228 (2001)). Antes de la implantación subcutánea, se inyectaron i.p. en ratones nu/nu NCr (pase 1) 10 x 10⁶ células OVCAR-3 cultivadas *in vitro* (pase 32) en solución salina al 0,9 %. Siete semanas más
 60

tarde, se recolectaron células tumorales por lavado peritoneal, y se inyectaron 5×10^6 células en un conjunto nuevo de receptores (pase 2). Cuatro semanas más tarde, las células se recolectaron por lavado peritoneal y se sometieron a un pase más, y 5×10^6 células se inyectaron en un conjunto nuevo de receptores (pase 3). Después de tres semanas, se recolectaron células del pase 3 y las mismas se sometieron a ensayo en relación con la viabilidad y la expresión del CA 125/O772P.

Para los estudios radioinmonoterapéuticos, se implantaron células del pase 3 para crecimiento subcutáneo del tumor. Las células del pase 3 eran de manera rutinaria $>95\%$ viables y conservaban niveles altos de expresión de CA 125/O772P según se confirmó por citometría de flujo. Para el crecimiento de tumor sólido, ectópico, se resuspendieron células a una concentración final de 15×10^6 células/ml en una mezcla de Matrigel (Matrigel, BD Biosciences: Lote n.º 005002, 14,6 mg/ml) y solución salina al 0,9 %, siendo la concentración final de Matrigel de 7,3 mg/ml. Se inyectaron ratones con 0,2 ml de volumen de la suspensión celular para una dosis final de 3×10^6 células. Las suspensiones celulares se inyectaron subcutáneamente en el lado ventral del área abdominal usando una aguja de calibre 23. El sitio de inyección se dejó aséptico limpiándolo con gasa estéril en etanol al 70 %. Aproximadamente 10 días después de la implantación, se midieron tumores palpables con calibradores electrónicos (Fowler Instruments) a través de dos dimensiones perpendiculares. Los ratones se clasificaron en grupos de 10 basándose en el volumen del tumor. Para todos los grupos dentro de un estudio, no existieron diferencias significativas entre los volúmenes medios de los tumores. Dos veces por semana, se registraron mediciones y observación de los tumores. El volumen de los tumores se calculó usando la fórmula convencional ($\text{Longitud} \times \text{Anchura}^2$) $\times 0,5$.

Acoplamiento de 776.1 a ^{131}I Yodo

El 776.1 de IgG1 murino se yodó en Perkin-Elmer con el método IODO-GEN modificado (Visser et al., J. Nucl. Med. 42: 509-519 (2001)) que es un medio eficaz de acoplar dosis elevadas de 1311 a un anticuerpo monoclonal al mismo tiempo que se minimizan los daños tanto químicos como los inducidos por radiación. A 10 mCi de ^{131}I se le añadieron diez microlitros de una solución de 1,41 mg/ml de ácido ascórbico, pH 5,0, y la mezcla se incubó durante un minuto. A esto le siguió la adición de 100 μl de fosfato 0,5 M, pH 7,4. A continuación, se añadieron 0,5 mg de anticuerpo monoclonal 776.1 (calculado usando la concentración de anticuerpo para establecer el volumen requerido). A esto le siguió la adición de 35 μl de una solución 1 mg/ml de IODO-GEN en acetonitrilo. Después de una incubación de 3 minutos, se añadieron 100 μl de una solución de ácido ascórbico (25 mg/ml, pH 5,0). Después de otros 5 minutos, se añadieron 100 μl de albúmina sérica bovina (MSA) al 0,1 % en PBS 50 mM. Después de otra incubación de 4 minutos, se analizó la incorporación de ^{131}I mediante cromatografía en capa fina instantánea (ITLC) en solución salina normal. El yodo no incorporado se eliminó por separación usando cromatografía con Sephadex G-25 con columnas NAP-10 prerellenadas (Amersham-Pharmacia) con PBS que contenía MSA al 0,1 % como tampón. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente. Se analizó el anticuerpo monoclonal purificado en relación con el contenido de yodo libre nuevamente por ITLC, y el mismo se consideró adecuado si el yodo libre era $<5\%$ del yodo total presente.

Inmunoreactividad de 776.1 radiomarcado por ELISA

Se determinó mediante el ensayo ELISA la inmunoreactividad del 776.1 radiomarcado. Placas de 96 pocillos Immulon 4 (Dynatech) se recubrieron con 100 μl por pocillo de 3 repeticiones de O772P con una etiqueta (purificada por afinidad) de hemaglutinina (HA) a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en DPBS durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se bloquearon con 200 μl por pocillo de tampón de bloqueo (1 x PBS con BSA al 1 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. El 776.1 no marcado y radiomarcado se diluyó a 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón de bloqueo y se añadió a la primera fila de la placa bloqueada por triplicado a 150 μl por pocillo; a los pocillos restantes se les añadieron 100 μl de tampón de bloqueo. A continuación, los anticuerpos se diluyeron de forma seriada tres veces para un total de 7 diluciones. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente seguido por tres lavados con DPBS que contenía Tween- 20 (PBST; 200 μl por pocillo) al 0,05 %. Para la detección de señales, a cada pocillo se añadieron 100 μl de IgG anti-ratón de cabra, conjugada con HRP (Amersham-Biosciences Piscataway, NJ), diluida 1:2.000, y los mismos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBST, y el conjugado de HRP se detectó adicionando una mezcla de sustrato de TMB (KPL) y H_2O_2 (relación 1: 1; 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$). Las placas se incubaron durante 10 minutos, y se midió la absorbancia a 650 nm usando un lector de placas (Molecular Devices). Se determinó la inmunoreactividad comparando las concentraciones de anticuerpo radiomarcado y no marcado en las que se logró el 50 % de saturación.

Radioinmunoterapia (RIT) monodosis con [^{131}I]776.1

A ratones portadores de tumores OVCAR-3 establecidos (comprendidos idealmente en volumen de 150 mm^3 a 250 mm^3) se les administró una única inyección i.v. de [^{131}I]776.1 (IgG1 de ratón) en 0,2 ml de cloruro sódico al 0,9 %.

Para todos los estudios, grupos de 10 ratones recibieron de 100 o 300 μCi de ^{131}I]776.1 en cloruro sódico al 0,9 %. Los grupos de control consistieron en ratones inyectados con cloruro sódico al 0,9 % en solitario o 776.1 no marcado en una dosis equivalente a la dosis de proteína proporcionada en el grupo de 776.1 radiomarcado con dosis alta. Los tumores se midieron dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor fue mayor que el 10 % de su peso corporal.

Resultados:

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

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

7.0. ENSAYOS DE COMPETICIÓN DE ANTICUERPOS/FRAGMENTOS DE ANTICUERPO DE UNIÓN A ANTÍGENOS

Ensayo de competición cruzada ELISA

Los anticuerpos que se van a someter a prueba se biotinilan usando el Kit de Biotinilación de Sulfo-NHS-LC EZ-Link (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), según las instrucciones del fabricante, seguido por la eliminación del reactivo de biotinilación que no ha reaccionado, por diálisis contra 1 l de solución salina tamponada con fosfato con 2 cambios de tampón a 4 °C durante 48 horas. Se recubren placas de noventa y seis pocillos con 100 μl (por pocillo) de 1 $\mu\text{g/ml}$ de 0772P de 3 repeticiones en tampón de bicarbonato (0,2 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9,6, Sigma) durante una noche a 4 °C.

Al día siguiente, las placas se lavan tres veces con 200 μl 1 x PBST (1 x solución salina tamponada con fosfato (PBS), Tween 20 al 0,05 %) y se bloquean con 100 μl de 1 x PBST que contiene albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con 1 x PBST, se obtiene una curva de titulación de 0 a 1000 veces de exceso de anticuerpo competidor (con respecto al anticuerpo marcado añadido en una etapa posterior) en 95 μl 1 x PBST + BSA al 1 % que se adiciona a la placa en pocillos independientes y se incuba durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se adiciona un anticuerpo biotinilado en 5 μl de 1 x PBST + BSA al 1 %, y el mismo se incuba durante 1 hora adicional a temperatura ambiente. La concentración de anticuerpo biotinilado añadido es aquella concentración con la cual se logra el 70 % de unión máxima de la proteína de 3 repeticiones de 0772P en ausencia de un competidor usando las condiciones de detección que se describen a continuación. La cantidad de anticuerpo añadido depende de las características de la unión y se determina de manera rutinaria empíricamente en estudios piloto.

A continuación, las placas se lavan tres veces con 1 x PBST. Para la detección de señales, en cada pocillo se adicionan 100 μl de Estreptavidina-HRP (dilución 1:4000-1:8000 en 1 x PBST + BSA 1 %, Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, Alabama)), y los mismos se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavan tres veces con 1 x PBST. Finalmente, en cada pocillo se adicionan 100 μl de mezcla de sustrato de TMB y H_2O_2 (relación 1:1, KPL) y se mide la absorbancia a 405 nm con un lector de placas (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). El ensayo se realiza por triplicado para cada anticuerpo y se calculan los valores promedio.

Se determina la competición no específica usando IgG1 de ratón normal en lugar de un competidor específico. En

cada experimento, se incluyen también controles para reactivos blancos e individuales, así como autocompetición. El porcentaje de inhibición (menos competición no específica) se representa en función de la competición del competidor, y se determina la CI_{50} , o la concentración de competidor en la que se observa el 50 % de competición.

5 **Ensayo de competición cruzada FACS**

Los anticuerpos que se van a someter a prueba se biotinilan usando el Kit de Biotinilación de Sulfo-NHS-LC EZ-Link (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), según las instrucciones del fabricante, seguido por la eliminación del reactivo de biotinilación que no ha reaccionado mediante diálisis contra 1 l de solución salina tamponada con fosfato con 2 cambios de tampón a 4 °C durante 48 horas. Las células OVCAR-3 cultivadas se recolectan y se lavan en tampón FACS (1 x solución salina tamponada con fosfato (DPBS) de Dulbecco, Na₃N al 0,05 %, BSA al 2 %). Se preparan ensayos de competición en placas de 96 pocillos en un volumen total de 50 µl.

Una titulación de entre 0 y 100 veces de exceso de anticuerpo competidor no marcado (con respecto al anticuerpo biotinilado añadido en una etapa posterior) en 20 µl se adiciona a 25 µl de células OVCAR-3 (4 x 10⁵) suspendidas en tampón FACS (en pocillos independientes), se mezcla minuciosamente, se dispensa en una placa de 96 pocillos, y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, a cada pocillo que contiene células se le adicionan cinco microlitros de anticuerpo biotinilado en tampón FACS, los mismos se mezclan minuciosamente, y se incuban a temperatura ambiente durante unos 30 minutos adicionales. La cantidad de anticuerpo usada es la concentración mínima en la que se logra la unión máxima de células OVCAR-3, expresada como el porcentaje de células positivas. La cantidad de anticuerpo añadida depende de las características de la unión y se determina de manera rutinaria empíricamente en estudios piloto.

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

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

8.0. DEPÓSITOS DE HIBRIDOMA

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

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

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

El hibridoma 776.1, que secreta el anticuerpo monoclonal 776.1 se depositó el 2 de agosto de 2002, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de

Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-4570.

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

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

15 El hibridoma 16H9 que secreta el anticuerpo monoclonal 16H9 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-510S.

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

25 El hibridoma 7 A11 que secreta el anticuerpo monoclonal 7 A11 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5110.

30 El hibridoma 7C6 que secreta el anticuerpo monoclonal 7C6 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5111.

35 El hibridoma 7F10 que secreta el anticuerpo monoclonal 7F10 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5112.

40 El hibridoma 7G10 que secreta el anticuerpo monoclonal 7G10 se depositó el 4 de junio de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso 5245.

45 El hibridoma 7H1 que secreta el anticuerpo monoclonal 7H1 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5114.

El hibridoma 8A1 que secreta el anticuerpo monoclonal 8A1 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5115.

50 El hibridoma 8BS que secreta el anticuerpo monoclonal 8BS se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5116.

55 El hibridoma 8C3 que secreta el anticuerpo monoclonal 8C3 se depositó el 4 de junio de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso 5246.

60 El hibridoma 8E3 que secreta el anticuerpo monoclonal 8E3 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5118.

El hibridoma 8G9 que secreta el anticuerpo monoclonal 8G9 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5119.

5

El hibridoma 325.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 325.1 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5120. El hibridoma 325.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 325.1 se depositó el 3 de abril de 2003, con la

10

ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5120.

El hibridoma 621.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 621.1 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5121.

15

El hibridoma 633.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 633.1 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5122.

20

El hibridoma 654.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 654.1 se depositó el 4 de junio de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso 5247.

25

El hibridoma 725.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 725.1 se depositó el 3 de abril de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5124.

30

El hibridoma 446.1 que secreta el anticuerpo monoclonal 446.1 se depositó el 25 de septiembre de 2003, con la ATCC®, según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines de los Procedimientos en Materia de Patentes, y se le asignó el número de acceso PTA-5549. También se divulgan los siguientes:

35

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une de manera preferente al polipéptido CA 125/0772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/0772P desprendido.

40

2. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Competición ELISA, muestra menos de aproximadamente el 25 % de inhibición de unión al péptido de la Figura 1 en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/0772P desprendido sobre el péptido de la Figura 1.

45

3. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 2, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Competición ELISA, muestra menos de aproximadamente el 20 % de inhibición de unión al péptido de la Figura 1 en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/0772P desprendido sobre el péptido de la Figura 1.

50

4. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 3, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Competición ELISA, muestra menos de aproximadamente el 15 % de inhibición de unión al péptido de la Figura 1 en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/0772P desprendido sobre el péptido de la Figura 1.

55

5. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 4, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Competición ELISA, muestra menos de aproximadamente el 10 % de inhibición de unión al péptido de la Figura 1 en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/0772P desprendido sobre el péptido de la Figura 1.

60

6. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 5, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Competición ELISA, muestra menos de aproximadamente el 5 % de inhibición de unión al péptido de la Figura 1 en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/0772P desprendido sobre el péptido de la Figura 1.

7. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Citometría de Flujo, muestra una CI_{50} , que se mide por porcentaje de células positivas, de al menos aproximadamente 0,05 mg/ml de CA 125/O772P desprendido.
8. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 7, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Citometría de Flujo, muestra una CI_{50} , que se mide por porcentaje de células positivas, de al menos aproximadamente 0,25 mg/ml de CA 125/O772P desprendido.
9. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 8, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Citometría de Flujo, muestra una CI_{50} , que se mide por porcentaje de células positivas, de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml de CA 125/O772P desprendido.
10. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 9, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Citometría de Flujo, muestra una CI_{50} , que se mide por porcentaje de células positivas, de al menos aproximadamente 0,75 mg/ml de CA 125/O772P desprendido.
11. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 10, donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Citometría de Flujo, muestra una CI_{50} , que se mide por porcentaje de células positivas, de al menos aproximadamente 1,0 mg/ml de CA 125/O772P desprendido.
12. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une al péptido de la Figura 1, pero no se une de forma detectable al CA 125/O772P desprendido.
13. El anticuerpo aislado de 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo de clase IgG.
14. El anticuerpo aislado de 13, donde el anticuerpo es un isotipo IgG₁.
15. El anticuerpo aislado de 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
16. El anticuerpo aislado de 15, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico monoclonal.
17. El anticuerpo aislado de 16, donde el anticuerpo quimérico monoclonal comprende una región constante Cy1.
18. El anticuerpo aislado de 16, donde el anticuerpo quimérico monoclonal comprende una región constante Cy4.
19. El anticuerpo aislado de 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.
20. El anticuerpo aislado de 15, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano.
21. El anticuerpo aislado de 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
22. El anticuerpo aislado de 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.
23. El anticuerpo aislado de 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
24. El anticuerpo aislado de 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario, F_vs unido a disulfuro, un F_vs monocatenario o un anticuerpo antiidiotipo.
25. El fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de 1, donde el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento que contiene VL, un fragmento que contiene VH o un fragmento que contiene una región determinante de complementariedad (CDR).
26. Un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 4E7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5109), 7A11 (Acceso ATCC® N.º PTA-5110), 7C6 (Acceso ATCC® N.º PTA-5111), 7F10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5112), 7G10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5245), 7H1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5114), 8A1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5115), 8B5 (Acceso ATCC® N.º PTA-5116), 8C3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5246), 8E3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5118), 8G9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5119), 15C9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5106), 16C7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5107), 16H9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5108), 117.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4567), 325.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5120), 368.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4568), 446.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5549), 501.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4569), 621.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5121), 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5124) o 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570).
27. Un anticuerpo monoclonal que compite con la unión del anticuerpo monoclonal de 26.
28. Un hibridoma que se deposita como el hibridoma 4E7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5109), 7A11 (Acceso ATCC® N.º PTA-5110), 7C6 (Acceso ATCC® N.º PTA-5111), 7F10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5112), 7G10 (Acceso ATCC® N.º PTA-5245), 7H1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5114), 8A1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5115), 8B5 (Acceso ATCC® N.º PTA-5116), 8C3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5246), 8E3 (Acceso ATCC® N.º PTA-5118), 8G9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5119), 15C9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5106), 16C7 (Acceso ATCC® N.º PTA-5107), 16H9 (Acceso ATCC® N.º PTA-5108), 117.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4567), 325.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5120), 368.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4568), 446.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5549), 501.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4569), 621.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5121), 633.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5122), 654.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5247), 725.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-5124), o 776.1 (Acceso ATCC® N.º PTA-4570).
29. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:27.
30. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:29.
31. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de

aminoácidos representada en la SEQ ID NO:31.

32. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:33.
- 5 33. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:54.
34. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:56.
- 10 35. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:28.
36. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30.
- 15 37. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:32.
- 20 38. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:34.
39. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:53.
- 25 40. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:55.
41. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 29, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:28.
- 30 42. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 30, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:30.
- 35 43. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 31, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:32.
44. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 32, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:34.
- 40 45. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 33, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:53.
46. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 34, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO:55.
- 45 47. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una región de cadena variable del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de cualquiera de 29 a 40.
48. La molécula de ácido nucleico de 41, donde la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO:35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 52, 57, 58 o 59.
- 50 49. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une al péptido de la Figura 1 con una K_d de menos de aproximadamente 100 nM según se mide en un ensayo de afinidad BIAcore.
50. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 49, donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une al péptido de la Figura 1 con una K_d de menos de aproximadamente 10 nM según se mide en un ensayo de afinidad BIAcore.
- 55 51. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 50, donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une al péptido de la Figura 1 con una K_d de menos de aproximadamente 1 nM según se mide en un ensayo de afinidad BIAcore.
- 60 52. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 51, donde el anticuerpo, o fragmento

- de anticuerpo de unión a antígenos se une al péptido de la Figura 1 con una K_d de menos de aproximadamente 100 pM según se mide en un ensayo de afinidad BIAcore.
53. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 52, donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une al péptido de la Figura 1 con una K_d de menos de aproximadamente 10 pM según se mide en un ensayo de afinidad BIAcore.
54. El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se modifica por sustitución, delección o adición de aminoácidos, o una combinación de las mismas, y tiene la misma afinidad o una afinidad aumentada para el CA 125/O772P asociado a células con respecto a la de un anticuerpo no modificado correspondiente o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.
55. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se modifica por sustitución, delección o adición de aminoácidos, o una combinación de las mismas, y donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos muestra la misma semivida en suero o una semivida en suero aumentada en comparación con un anticuerpo no modificado correspondiente o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.
56. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo media la lisis de una célula tumoral positiva para CA 125/O772P en un ensayo de ADCC.
57. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 56, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo media al menos aproximadamente el 10 % de la lisis de una célula tumoral positiva para CA 125/O772P en un ensayo de ADCC en una relación 50:1 de efector:diana a una concentración de 5,0 μg de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml.
58. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 56, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo media al menos aproximadamente el 10 % de la lisis de una célula tumoral positiva para CA 125/O772P en un ensayo de ADCC en una relación 25:1 de efector:diana a una concentración de 5,0 μg de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml.
59. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 56, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo media al menos aproximadamente el 10 % de la lisis de una célula tumoral positiva para CA 125/O772P en un ensayo de ADCC en una relación 12,5:1 de efector:diana a una concentración de 5,0 μg de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml.
60. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 56, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo media al menos aproximadamente el 10 % de la lisis de una célula tumoral positiva para CA 125/O772P en un ensayo de ADCC en una relación 12,5:1 de efector:diana a una concentración de 50 ng de anticuerpo o fragmento de unión a antígenos por ml.
61. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo media la lisis de una célula tumoral positiva para CA 125/O772P en un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).
62. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 61, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo media en un intervalo de aproximadamente el 15 % de la lisis a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos con respecto a aproximadamente el 95 % de la lisis a aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.
63. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo inhibe el crecimiento tumoral positivo para CA 125/O772P.
64. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a un polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto a un polipéptido CA 125/O772P desprendido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
65. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo monoclonal de unión a antígenos que se une de manera preferente a un polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto a un polipéptido CA 125/O772P desprendido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
66. Un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células con respecto a CA 125/O772P desprendido, y un vehículo farmacéuticamente aceptable contenido dentro del material de envasado, estando dicha composición farmacéutica en una forma adecuada para su administración a un sujeto.
67. El artículo de fabricación de 66, que comprende además instrucciones impresas con respecto al uso o administración de la composición farmacéutica.
68. El artículo de fabricación de 67, donde las instrucciones sugieren un régimen de dosificación para la prevención o tratamiento de uno o más síntomas de un trastorno relacionado con CA 125/O772P.
69. El artículo de fabricación de 67, donde las instrucciones sugieren un régimen de dosificación para la prevención o tratamiento de uno o más síntomas de un trastorno proliferativo celular.
70. El artículo de fabricación de 69, donde las instrucciones sugieren un régimen de dosificación para la prevención o tratamiento de uno o más síntomas de un cáncer.

71. El artículo de fabricación de 70, donde las instrucciones sugieren un régimen de dosificación para la prevención o tratamiento de uno o más síntomas de cáncer de ovario.
72. El artículo de fabricación de 66, que comprende además una etiqueta con respecto al uso o administración de la composición farmacéutica.
- 5 73. El artículo de fabricación de 66, donde la etiqueta sugiere un régimen de dosificación para la prevención o tratamiento de uno o más síntomas de un trastorno relacionado con CA 125/O772P.
74. El artículo de fabricación de 73, donde la etiqueta sugiere un régimen de dosificación para la prevención o tratamiento de uno o más síntomas de un trastorno proliferativo celular.
75. El artículo de fabricación de 74, donde la etiqueta sugiere un régimen de dosificación para la prevención o
10 tratamiento de uno o más síntomas de un cáncer.
76. El artículo de fabricación de 75, donde la etiqueta sugiere un régimen de dosificación para la prevención o tratamiento de uno o más síntomas de un cáncer de ovario.
77. Un polipéptido de fusión que comprende un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células con respecto a CA 125/O772P desprendido, unido
15 operativamente a un agente heterólogo.
78. Un método para mejorar un síntoma de un trastorno relacionado con el CA 125/O772P, que comprende: administrar a un sujeto que necesite dicha mejora, un anticuerpo o fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo en una cantidad suficiente para mejorar un síntoma del trastorno proliferativo celular, donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células
20 con respecto al CA 125/O772P desprendido.
79. El método de 78, donde el trastorno relacionado con CA 125/O772P es un trastorno proliferativo celular.
80. El método de 79, donde el trastorno proliferativo celular es cáncer.
81. El método de 80, donde el cáncer es cáncer de cérvix o de útero.
82. El método de 80, donde el cáncer es cáncer de mama o de pulmón.
- 25 83. El método de 80, donde el cáncer es cáncer de ovario.
84. El método de 78, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal de unión a antígenos.
85. El método de 78, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se administra a una dosis de aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg.
- 30 86. El método de 78, donde el método se pone en práctica como parte de una terapia de combinación contra el cáncer.
87. El método de 86, donde la terapia de combinación contra el cáncer comprende además la administración de un agente quimioterapéutico al sujeto.
88. El método de 87, donde el agente quimioterapéutico es paclitaxel o cisplatino.
- 35 89. El método de 86, donde la terapia de combinación contra el cáncer comprende terapia de radiación.
90. El método de 78, donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en 325.1, 621.1, 633.1, 654.1, 725.1, 8G9, 7F10, 8A1, 8C3, 15C9, 8E3, 8B5, 7G10, 16C7, 7C6, 7H1, 16H9, 7A11, 4E7, 117.1, 368.1, 446.1, 501.1 y 776.1.
91. Un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente al CA 125/O772P asociado a células, que comprende:
- 40 (a) incubar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos con un péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células, en presencia de CA 125/O772P desprendido, en condiciones que permiten la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos a dicho péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células o bien al CA 125/O772P desprendido;
- 45 (b) eliminar el CA 125/O772P desprendido y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos no unido a dicho péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células;
- (c) medir la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos unido a dicho péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células; y
- (d) comparar la cantidad en (c) con respecto a la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a
50 antígenos que se une a dicho péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células en ausencia del CA 125/O772P desprendido.
92. El método de 91, donde el péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células está inmovilizado sobre una superficie sólida.
93. El método de 92, donde el método se realiza en un formato ELISA.
- 55 94. El método de 91, donde el CA 125/O772P desprendido y el péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células están presentes aproximadamente a una relación 25:1 (p/p) de CA 125/O772P desprendido con respecto al péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células.
95. Un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, que comprende:
- 60 (a) poner en contacto un anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con un péptido que comprende CA

- 125/O772P asociado a células en presencia de CA 125/O772P desprendido en condiciones que permiten la unión del péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células al anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos;
- (b) eliminar el péptido no unido que comprende CA 125/O772P asociado a células;
- 5 (c) medir la cantidad de péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células unido por el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, y
- (d) comparar la cantidad medida en (c) con la cantidad de péptido que comprende CA 125/O772P asociado a células, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se une en ausencia de CA 125/O772P desprendido.
- 10 96. El método de 95, donde la cantidad de CA 125/O772P desprendido es aproximadamente una cantidad en exceso de 25 veces (peso/peso).
97. El método de 95, donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos está inmovilizado sobre una superficie sólida.
98. El método de 97, donde el método se realiza en un formato ELISA.
- 15 99. Un método para ayudar en la identificación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une de manera preferente a CA 125/O772P asociado a células, que comprende:
- (a) poner en contacto un anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos, con una célula que expresa CA 125/O772P asociado a células en presencia de CA 125/O772P desprendido en condiciones que permiten la unión del CA 125/O772P al anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos;
- 20 (b) eliminar las células no unidas;
- (c) medir la cantidad de células que expresan CA 125/O772P unidas por el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, y
- (d) comparar la cantidad medida en (c) con la cantidad de células que expresan CA 125/O772P que se une al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos en ausencia de dicha cantidad de CA 125/O772P desprendido.
- 25 100. El método de 99, donde la cantidad de CA 125/O772P desprendido es al menos aproximadamente 0,5 mg/ml.
101. El método de 99, donde la medición se realiza por citometría de flujo.
102. El método de 99, donde la medición se realiza por clasificación celular activada por fluorescencia.
103. Un hibridoma que puede secretar un anticuerpo de 1.
- 30 104. El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígenos, de 1 conjugado con un agente citotóxico.
105. El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígenos, de 104, donde el agente citotóxico es un radioisótopo.
106. El anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno, de 105, donde el radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{90}Y .
107. El anticuerpo monoclonal de 26 o 27, que está conjugado con un agente citotóxico.
- 35 108. El anticuerpo monoclonal de 107, donde el agente citotóxico es un radioisótopo.
109. El anticuerpo monoclonal de 108, donde el radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{90}Y .
110. La composición farmacéutica de 64 o 65, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos, está conjugado con un agente citotóxico.
- 40 111. La composición farmacéutica de 110, donde el agente citotóxico es un radioisótopo.
112. La composición farmacéutica de 111, donde el radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{90}Y .
113. El método de 78, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígenos, está conjugado a partir de un agente citotóxico.
- 45 114. El método de 113, donde el agente citotóxico es un radioisótopo.
115. El método de 114, donde el radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y ^{90}Y .
116. Un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 325.1, 621.1, 633.1, 654.1, 725.1, 8G9, 7F10, 8A1, 8C3, 15C9, 8E3, 8B5, 7G10, 16C7, 7C6, 7H1, 16H9, 7A11, 4E7, 117.1, 368.1, 446.1, 501.1 y 776.1, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de los mismos.
- 50 117. Un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, que compite con la unión de un anticuerpo monoclonal de 116.
118. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 325.1, 621.1, 633.1, 654.1, 725.1, 8G9, 7F10, 8A1, 8C3, 15C9, SE3, 8B5, 7G10, 16C7, 7C6, 7H1, 16H9, 7A11, 4E7, 117.1, 368.1, 446.1, 501.1, y 776.1, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos de los mismos, y un
- 55 vehículo farmacéuticamente aceptable.
119. Un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos que se une al péptido de la Figura 1.

LISTA DE SECUENCIAS

- 60 <110> Euro-Celtique S.A.

ES 2 641 525 T3

<120> ANTICUERPOS QUE SE UNEN A CA 125/0772P ASOCIADO A CÉLULAS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> 6750-214-228

<140> A asignar

5

<141> 15/10/2003

<150> 60/485.986

<151> 10/07/2003

<150> 60/418.828

<151> 12/10/2003

10

<160> 71

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 748

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3 repeticiones de CA 125/0772P

<400> 1

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

20

ES 2 641 525 T3

Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro Thr Thr Pro Lys Pro Ala Thr Thr
 305 310 315 320
 Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala Thr Thr Ala Met Gly Tyr His Leu
 325 330 335
 Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro
 340 345 350
 Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu
 355 360 365
 Gln His Leu Leu Arg Pro Leu Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe
 370 375 380
 Tyr Leu Gly Cys Gln Leu Ile Ser Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala
 385 390 395 400
 Ala Thr Gly Val Asp Thr Thr Cys Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly
 405 410 415
 Pro Gly Leu Asp Ile Gln Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr
 420 425 430
 His Gly Val Thr Gln Leu Gly Phe Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu
 435 440 445
 Phe Ile Asn Gly Tyr Ala Pro Gln Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr
 450 455 460
 Gln Ile Asn Phe His Ile Val Asn Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp Pro
 465 470 475 480
 Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Ile Gln Asp Lys Val
 485 490 495
 Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser Gln Leu His Asp Thr Phe Arg Phe Cys
 500 505 510
 Leu Val Thr Asn Leu Thr Met Asp Ser Val Leu Val Thr Val Lys Ala
 515 520 525
 Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp Pro Ser Leu Val Glu Gln Val Phe Leu
 530 535 540
 Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser Phe His Trp Leu Gly Ser Thr Tyr Gln
 545 550 555 560
 Leu Val Asp Ile His Val Thr Glu Met Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro
 565 570 575
 Thr Ser Ser Ser Ser Thr Gln His Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr
 580 585 590
 Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp Lys Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr
 595 600 605
 Gln Arg Asn Lys Arg Asn Ile Glu Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg
 610 615 620
 Asn Ser Ser Ile Lys Ser Tyr Phe Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe
 625 630 635 640
 Arg Ser Val Pro Asn Arg His His Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn
 645 650 655
 Phe Ser Pro Leu Ala Arg Arg Val Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu
 660 665 670
 Phe Leu Arg Met Thr Arg Asn Gly Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu
 675 680 685
 Asp Arg Ser Ser Val Leu Val Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu
 690 695 700
 Pro Leu Thr Gly Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser
 705 710 715 720
 Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 725 730 735
 Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His His
 740 745
 <210> 2
 <211> 809
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 3 repeticiones TM de CA 125/0772P
 <400> 2

5

ES 2 641 525 T3

Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr Lys Leu Phe Thr His
1 5 10 15
Arg Ser Ser Val Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gly Thr Pro Thr Val Tyr
20 25 30
Leu Gly Ala Ser Lys Thr Pro Ala Ser Ile Phe Gly Pro Ser Ala Ala
35 40 45
Ser His Leu Leu Ile Leu Phe Thr Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu
50 55 60
Arg Tyr Glu Glu Asn Met Trp Pro Gly Ser Arg Lys Phe Asn Thr Thr
65 70 75 80
Glu Arg Val Leu Gln Gly Leu Leu Arg Pro Leu Phe Lys Asn Thr Ser
85 90 95
Val Gly Pro Leu Tyr Ser Gly Cys Arg Leu Thr Leu Leu Arg Pro Glu
100 105 110
Lys Asp Gly Glu Ala Thr Gly Val Asp Ala Ile Cys Thr His Arg Pro
115 120 125
Asp Pro Thr Gly Pro Gly Leu Asp Arg Glu Gln Leu Tyr Leu Glu Leu
130 135 140
Ser Gln Leu Thr His Ser Ile Thr Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp
145 150 155 160
Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn Gly Phe Thr His Arg Ser Ser Val Pro
165 170 175
Thr Thr Ser Thr Gly Val Val Ser Glu Glu Pro Phe Thr Leu Asn Phe
180 185 190
Thr Ile Asn Asn Leu Arg Tyr Met Ala Asp Met Gly Gln Pro Gly Ser
195 200 205
Leu Lys Phe Asn Ile Thr Asp Asn Val Met Lys His Leu Leu Ser Pro
210 215 220
Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu Gly Ala Arg Tyr Thr Gly Cys Arg Val
225 230 235 240
Ile Ala Leu Arg Ser Val Lys Asn Gly Ala Glu Thr Arg Val Asp Leu
245 250 255
Leu Cys Thr Tyr Leu Gln Pro Leu Ser Gly Pro Gly Leu Pro Ile Lys
260 265 270
Gln Val Phe His Glu Leu Ser Gln Gln Thr His Gly Ile Thr Arg Leu
275 280 285
Gly Pro Tyr Ser Leu Asp Lys Asp Ser Leu Tyr Leu Asn Gly Tyr Asn
290 295 300
Glu Pro Gly Pro Asp Glu Pro Pro Thr Thr Pro Lys Pro Ala Thr Thr
305 310 315 320
Phe Leu Pro Pro Leu Ser Glu Ala Thr Thr Ala Met Gly Tyr His Leu
325 330 335
Lys Thr Leu Thr Leu Asn Phe Thr Ile Ser Asn Leu Gln Tyr Ser Pro
340 345 350
Asp Met Gly Lys Gly Ser Ala Thr Phe Asn Ser Thr Glu Gly Val Leu
355 360 365
Gln His Leu Leu Arg Pro Leu Phe Gln Lys Ser Ser Met Gly Pro Phe
370 375 380
Tyr Leu Gly Cys Gln Leu Ile Ser Leu Arg Pro Glu Lys Asp Gly Ala
385 390 395 400
Ala Thr Gly Val Asp Thr Thr Cys Thr Tyr His Pro Asp Pro Val Gly
405 410 415
Pro Gly Leu Asp Ile Gln Gln Leu Tyr Trp Glu Leu Ser Gln Leu Thr
420 425 430
His Gly Val Thr Gln Leu Gly Phe Tyr Val Leu Asp Arg Asp Ser Leu
435 440 445
Phe Ile Asn Gly Tyr Ala Pro Gln Asn Leu Ser Ile Arg Gly Glu Tyr
450 455 460
Gln Ile Asn Phe His Ile Val Asn Trp Asn Leu Ser Asn Pro Asp Pro
465 470 475 480
Thr Ser Ser Glu Tyr Ile Thr Leu Leu Arg Asp Ile Gln Asp Lys Val
485 490 495
Thr Thr Leu Tyr Lys Gly Ser Gln Leu His Asp Thr Phe Arg Phe Cys

ES 2 641 525 T3

500 505 510
 Leu Val Thr Asn Leu Thr Met Asp Ser Val Leu Val Thr Val Lys Ala
 515 520 525
 Leu Phe Ser Ser Asn Leu Asp Pro Ser Leu Val Glu Gln Val Phe Leu
 530 535 540
 Asp Lys Thr Leu Asn Ala Ser Phe His Trp Leu Gly Ser Thr Tyr Gln
 545 550 555 560
 Leu Val Asp Ile His Val Thr Glu Met Glu Ser Ser Val Tyr Gln Pro
 565 570 575
 Thr Ser Ser Ser Ser Thr Gln His Phe Tyr Leu Asn Phe Thr Ile Thr
 580 585 590
 Asn Leu Pro Tyr Ser Gln Asp Lys Ala Gln Pro Gly Thr Thr Asn Tyr
 595 600 605
 Gln Arg Asn Lys Arg Asn Ile Glu Asp Ala Leu Asn Gln Leu Phe Arg
 610 615 620
 Asn Ser Ser Ile Lys Ser Tyr Phe Ser Asp Cys Gln Val Ser Thr Phe
 625 630 635 640
 Arg Ser Val Pro Asn Arg His His Thr Gly Val Asp Ser Leu Cys Asn
 645 650 655
 Phe Ser Pro Leu Ala Arg Arg Val Asp Arg Val Ala Ile Tyr Glu Glu
 660 665 670
 Phe Leu Arg Arg Met Thr Arg Asn Gly Thr Gln Leu Gln Asn Phe Thr Leu
 675 680 685
 Asp Arg Ser Ser Val Leu Val Asp Gly Tyr Ser Pro Asn Arg Asn Glu
 690 695 700
 Pro Leu Thr Gly Asn Ser Asp Leu Pro Phe Trp Ala Val Ile Leu Ile
 705 710 715 720
 Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Leu Ile Thr Cys Leu Ile Cys Gly Val
 725 730 735
 Leu Val Thr Thr Arg Arg Arg Lys Lys Glu Gly Glu Tyr Asn Val Gln
 740 745 750
 Gln Gln Cys Pro Gly Tyr Tyr Gln Ser His Leu Asp Leu Glu Asp Leu
 755 760 765
 Gln Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu
 770 775 780
 Gly Pro Arg Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Met
 785 790 795 800
 His Thr Gly His His His His His His

805

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR 117.1 VH1

<400> 3

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro Gly Met Gly Val Gly

1 5 10

10 <210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CDR 117.1 VH2

<400> 4

His Ile Trp Trp Asp Asp Phe Lys Arg Asp Asn Pro Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 5

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR 117.1 VH3

<400> 5

ES 2 641 525 T3

Val Asp Gly Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 117.1 VL1
 <400> 6
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 10 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> CDR 117.1 VL2
 <400> 7
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 20 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 117.1 VL3
 <400> 8
 Ser Gln Ser Arg Tyr Val Pro Glu Thr
 25 1 5
 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> CDR 368.1 VH1
 <400> 9
 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Phe Tyr Met His
 1 5 10
 35 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 368.1 VH2
 40 <400> 10
 Tyr Val Ser Cys Tyr Thr Gly Ala Thr Thr Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 368.1 VH3
 <400> 11
 Glu Gly Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Phe
 1 5
 50 <210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 641 525 T3

<220>
 <223> CDR 368.1 VL1
 <400> 12
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Arg Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 5 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> CDR 368.1 VL2
 <400> 13
 Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 368.1 VL3
 <400> 14
 Ser Gln Thr Thr His Gly Pro Pro Thr
 1 5
 20 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> CDR 501.1 VH1
 <400> 15
 Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Gly Met Asn
 1 5 10
 30 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 501.1 VH2
 35 <400> 16
 Cys Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ile Tyr Ser Asp Asp Phe Arg
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 501.1 VH3
 <400> 17
 Gly Asn Tyr Arg Asp Ala Ile Asp Tyr
 1 5
 45 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> CDR 501.1 VL1
 <400> 18
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 19

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> CDR 501.1 VL2
 <400> 19
Tyr Ala Thr Thr Leu Ala Asp
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 501.1 VL3
 <400> 20
 15 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> CDR 776.1 VH1
 <400> 21
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Ile His
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 776.1 VH2
 <400> 22
Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asp Tyr Asn Gln Asn Phe
 30 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> CDR 776.1 VH3
 <400> 23
Arg Trp Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 24
 40 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 776.1 VL1
 45 <400> 24
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met Cys
 1 5 10
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 776.1 VL2
 <400> 25
Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 55 <210> 26

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> CDR 776.1 VL3
 <400> 26
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 27
 <211> 131
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena ligera 117.1 (117.1L)
 <400> 27
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ser Gln Ser Arg Tyr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 15 130
 <210> 28
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 117.1 (117.1H)
 <400> 28
 Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ser Thr Pro Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Phe Lys Arg Asp
 65 70 75 80
 Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser
 85 90 95
 Ser Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Val Asp Gly Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 <210> 29
 25 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 641 525 T3

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

<400> 29

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Glu Arg Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys
100 105 110

Ser Gln Thr Thr His Gly Pro Pro Thr Cys Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys

130

5 <210> 30

<211> 137

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 30

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

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg
20 25 30

Thr Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Gly Phe Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Leu Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Val Ser Cys Tyr Thr Gly Ala Thr Thr Tyr Thr
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Phe Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 31

<211> 128

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 31

ES 2 641 525 T3

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

His Asp Glu Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

<210> 32

5 <211> 137

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10 <400> 32

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Gln Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Cys Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ile Tyr Ser
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Ile Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Phe Ile Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Ala Ala Thr
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Arg Asp Ala Ile Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 33

<211> 127

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 33

ES 2 641 525 T3

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Leu Phe Ala Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ile Tyr Met Cys Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60
 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110
 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 <210> 34
 <211> 139
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 776.1 (776.1H)
 <400> 34
 Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 10
 Thr Asp Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ile Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Val Ser Asp Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Asn Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Ile Val Asp Asn Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 35
 <211> 393
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena ligera 117.1 (117.1L)
 <400> 35
 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttctggttc cagcagtgat 60
 gctgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca ggcctccatc 120
 tcttgagat ctagtccagag ccttgtagac agtaatggaa acacctattt acattggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaaactc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caggatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtagata tgttccgtgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 393
 20 <210> 36
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 117.1 (117.1H)
 <400> 36
 25

ES 2 641 525 T3

atgggcaggc ttacttcttc attcctgcta ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtcccag 60
 gttactctga aagagtctgg ccctgggata ttgcagccct cccagaccct cagtctgact 120
 tgttctttct ctgggttttc actgagcact cctggatgg gtgtaggctg gattcgtcag 180
 ccatcagggg agggtctgga gtggctggca cacatttggg gggatgattt caagcgcgat 240
 aatccagccc ttaagagccg actgactatc tctaaggata cctccagcag ccaggttttc 300
 ctcaaaatcg ccagtgtgga cactgcagat actgccacat attactgtgt tccagtggat 360
 ggtaacttcc tctcctggta tttcgatgtc tggggcgctg ggaccacggt caccgtctcc 420
 tca 423
 <210> 37
 <211> 393
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena ligera 368.1 (368.1L)
 <400> 37
 atgaagttgc ctgttaggct gttgggtctg atgttctgga ttctctgctc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagtccagag ccttgaacgc actaatggaa acacctattt acattgggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaaactc ctgatctaca aagtttccag ccgattttct 240
 ggggtcccag ataggttcag tggcagtgga tcagggcag atttcacact caagatcagt 300
 agagtggagg ctgaggatct ggggaattat ttctgttctc aaactacaca tggctctccg 360
 acgtgcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 393
 10 <210> 38
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 368.1 (368.1H)
 <400> 38
 atgggatgga tctggatctt tctcttcctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccactctgag 60

 gtccagctgc agcagtctgg acctgagtta gtgaggactg gggcttcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctggttactc attcactggg ttctacatgc actgggtcaa gcagagcctt 180
 ggaaagagcc ttgagtggat tggatatggt agttgttaca ctggtgctac tacctacacc 240
 cagaagtcca agggcaaggc cacatttact gttgacacat cctccagcac agcctacatg 300
 caactcaaca gcctgacatc tgaagactct gcggtctatt actgtgcaag agaaggggat 360
 tactattcta tggacttctg gggctcaagga acctcagtca ccgtctcctc a 411
 <210> 39
 20 <211> 386
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena ligera 501.1 (501.1L)
 25 <400> 39
 atggacatga gggcccctgc tcagtttttt gggatcttgt tgctctggtt tccaggtatc 60
 agatgtgaca tcaagatgac ccagtctcca tegtccattt atgcatcgct gggagagagg 120
 gtcactataa cttgcaaggc gagtccaggac attaaaagct atttaagctg gtaccaacag 180
 aaaccctgga aatctcctaa gaccctgato tattatgcaa caaccttggc agatggggtc 240
 ccatcaagat tcagtggcag tggatctggg caagattatt ctctaatacat caacagcctg 300
 gagtctgacg atatagctac ttatttctgt ctacaccatg atgagagccc attcacgttc 360
 ggctcgggga caaaattgga aataaa 386
 <210> 40
 <211> 411
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 501.1 (501.1H)
 <400> 40

ES 2 641 525 T3

atggcttggg tgtggacctt gctgttcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60
 atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt ccagatctcc 120
 tgcaaggctt ctggctatat cttcacagac tatggaatga actgggtgaa acaggctcca 180
 ggaaagggtt taaaatggat gggctgtata aacacctaca ctggagagac aatatatagt 240
 gatgacttca ggggacgggtt tgccatctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctttatt 300
 cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacgcg gcaacatatt tctgtgcaag gggaaattac 360
 agggatgcta ttgactattg gggcaagga acctcagtc a cgtctcctc a 411
 <210> 41
 <211> 383
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena ligera 776.1 (776.1L)
 <400> 41
 atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ttgcatctcc aggggagacg 120
 gtcacaatga cttgcagggc cagttcaagt gtaatttaca tgtgttgaa tcagcagaag 180
 ccagatcct ccccaaac ctggattat ggcacatcca ccctggcttc tggagtccct 240
 actcgttca gtggcagtg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtagag 300
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaaccatt cacgttcggc 360
 tcggggacaa agttggaaat aaa 383
 10 <210> 42
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 776.1 (776.1H)
 <400> 42
 atgggatgga gctggatcct tctcttcctc ctgtcaggaa ctgcaggcgt ccactctgag 60
 gtccagcttc agcagtcagg acctgagctg gtgaaacctg ggcctcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctggatacac attcactgac tacaacattc actgggtgaa acagagccat 180
 ggaaagatcc ttgagtggat tggatatatt tctcttata atggtgtttc tgactacaac 240
 cagaatttca agagcaaggc cacattgatt gtagacaatt cctccaacac agcctacatg 300
 gaactccgca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt attgtgcaag atgggacttc 360
 ggtagtggct actactttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 417
 <210> 43
 <211> 45
 20 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador (véase la sección 6.6)
 <400> 43
 25 rcgacuggag cagcaggaca cugacaugga cugaaggagu agaaa 45
 <210> 44
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador (véase la sección 6.6)
 <400> 44
 gctgtcaacg atacgtacg taacggcatg acagtgtttt tttttttt tttt 54
 <210> 45
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador (véase la sección 6.6)
 40 <400> 45
 aytccacac acagrrcca gtggatagac 30
 <210> 46
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador (véase la sección 6.6)
 <400> 46
 5 ggatacagtt ggtgcagcat c 21
 <210> 47
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador (véase la sección 6.6)
 <400> 47
 15 cgactggagc acgaggacac tga 23
 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador (véase la sección 6.6)
 <400> 48
 25 attaaccctc actaaagga 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador (véase la sección 6.6)
 <400> 49
 30 taatagcact cactataggg 20
 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador (véase la sección 6.6)
 <400> 50
 40 attaaccctc actaaagga 20
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador (véase la sección 6.6)
 45 <400> 51
 taatagcact cactataggg 20
 <210> 52
 <211> 383
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena ligera 725.1 (725.1L)
 <400> 52
 atggattttc aagtgcagat ttctcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttattctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120
 gtcacaaatga cttgcagggc cagttcaagt gtaagttcca ttactggta ccagcagaag 180
 ccagaatcct ccccaaacc ctggatttac gccacatcca acctggcttc tggagtccct 240
 gttcgcttca gtggcagtg gtctgggacc tcttatactc tcacaatcag cagaatggag 300
 gctgcagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta ttgatccagc cacgttcgga 360
 gggggacca agctggaaat aaa 383

ES 2 641 525 T3

<210> 53
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 725.1 (725.1H)
 <400> 53
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Tyr Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ala Ser Thr His
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Ser Gly Gly Asn Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 54
 10 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Región variable polipeptídica de cadena ligera 725.1 (725.1L)
 <400> 54
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Ile Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ser Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Ser Ser
 50 55 60
 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80
 Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Met Glu Ala Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 100 105 110
 Ser Ile Asp Pro Ala Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 <210> 55
 20 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 16H9 (16H9H)
 25 <400> 55

ES 2 641 525 T3

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp
 65 70 75 80
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Val Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser Asp Ile Tyr Tyr Gly Asn Pro Gly Gly Phe
 115 120 125
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140
 <210> 56
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

5

<223> Región variable polipeptídica de cadena ligera 16H9 (16H9L)
 <400> 56
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30
 Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser
 35 40 45
 Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60
 Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
 65 70 75 80
 Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
 85 90 95
 Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
 100 105 110
 Gln Tyr His Arg Ser Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ile

10

<210> 57
 <211> 406
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

15

<223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 725.1 (725.1H)
 <400> 57
 atggcttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60
 atccagttgg tgcagtctgg acctgaactg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120
 tgcaaggctt ctggatattc cttcacaac tatggaatga actgggtgaa gcaggtcca 180
 ggggaagggtt taaagtggat gggctggata aacgcctaca ttggagagcc aacatattgct 240
 gatgacttca agggacgatt tgccttctct ctggaagcct ctaccacac tgcctatttg 300
 cagatcaaca gcctcaaaag tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag tgggggtaac 360
 tcccttgact tttggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcag 406

20

<210> 58
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena pesada 16H9 (16H9H)
 <400> 58

ES 2 641 525 T3

atgaaatgca gctgggttat cttcttcctg atggcagtgg ttacaggggt caattcagag 60
 gttcagctgc agcagctctgg ggcagagctt gtgaagccag gggcctcagt caagttgtcc 120
 tgcacagctt ctggcttcaa cattaagac acctatatgc actgggtgaa gcagaggcct 180
 gaacagggcc tggagtggat tgggaaggatt gatcctgcga atggtaatac taaatatgac 240
 ccgaagtcc agggcaaggc cactataaca gcagacacat cctccaacac agcctacgtg 300
 cagctcagca gcctgacatc tgaggacact gccgtctatt actgtgctag tagtgacatc 360
 tactatggta accccggggg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 420
 gca 423
 <210> 59
 <211> 389
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Región variable polipeptídica de cadena ligera 16H9 (16H9L)
 <400> 59
 atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctct aggggaacgg 120
 gtcaccatga cctgcactgc cagctcaagt gtaagttcca gttacttgca ctggtaccag 180
 cagaagccag gatcctcccc caaactctgg atttatagca catccaacct ggcttctgga 240
 gtcccagctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc 300
 atggaggctg aagatgctgc cacttattac tggcaccagt atcatcgttc cccattcacg 360
 ttcggctcgg ggacaaagtt ggaaataaaa 389
 10 <210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> CDR 725.1 VH1
 <400> 60
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
 1 5 10
 <210> 61
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 725.1 VH2
 <400> 61
 Trp Ile Asn Ala Tyr Ile Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 25 Gly
 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 725.1 VH3
 <400> 62
 Gly Gly Asn Ser Leu Asp Phe
 35
 1 5
 <210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 725.1 VL1
 <400> 63
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile His
 1 5 10

ES 2 641 525 T3

<210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> CDR 725.1 VL2
 <400> 64
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 65
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 725.1 VL3
 15 <400> 65
 Gln Gln Trp Ser Ile Asp Pro Ala Thr
 1 5
 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 16H9 VH1
 <400> 66
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His
 1 5 10
 25 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> CDR 16H9 VH2
 <400> 67
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 68
 <211> 13
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 16H9 VH3
 <400> 68
 Ser Asp Ile Tyr Tyr Gly Asn Pro Gly Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10
 40 <210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> CDR 16H9 VL1
 <400> 69
 Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
 1 5 10
 50 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR 16H9 VL2

<400> 70
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 71
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> CDR 16H9 VL3
<400> 71
10 His Gln Tyr His Arg Ser Pro Phe Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a la región no repetida representada en la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:2, donde la región no repetida en la SEQ ID NO:1 se representa por los aminoácidos de 453 a 708 de la SEQ ID NO:1 y donde la región no repetida en la SEQ ID NO:2 se representa por los aminoácidos de 453 a 711 de la SEQ ID NO:2; y donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une de manera preferente al polipéptido CA 125/O772P asociado a células con respecto al polipéptido CA 125/O772P desprendido, si el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un Ensayo de Competición ELISA, muestra menos del $25 \pm 2,5$ % de inhibición de unión al péptido de SEQ ID NO:1 en presencia de un exceso de 25 veces (peso/peso) de CA 125/O772P desprendido sobre el péptido de SEQ ID NO:1; y/o el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, en un ensayo de competición por citometría de flujo, muestra una CI_{50} , según se mide por el porcentaje de células positivas, de al menos $0,05 \pm 0,005$ mg/ml de CA 125/O772P desprendido.
2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal humano.
4. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, donde el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, se une al péptido de SEQ ID NO:1 con una K_d de menos de 100 ± 10 nM, menos de 10 ± 1 nM, menos de $1 \pm 0,1$ nM, menos de 100 ± 10 pM o menos de 10 ± 1 pM, según se mida en un ensayo de afinidad BIAcore.
5. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se modifica por sustitución, delección o adición de aminoácidos, o una combinación de las mismas, y tiene la misma afinidad o una afinidad aumentada para el CA 125/O772P asociado a células con respecto a la de un anticuerpo no modificado correspondiente o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos.
6. El anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos se modifica por sustitución, delección o adición de aminoácidos, o una combinación de las mismas, y donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos muestra la misma semivida en suero o una semivida en suero aumentada en comparación con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígenos no modificados, correspondientes.
7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con CA 125/O772P, donde dicho trastorno relacionado con CA 125/O772P es un trastorno proliferativo celular, y donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra a un sujeto que necesita dicho tratamiento en una cantidad suficiente para mejorar un síntoma del trastorno proliferativo celular.
9. El anticuerpo aislado, o el fragmento de anticuerpo de unión a antígenos, para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho trastorno proliferativo celular es cáncer, preferentemente cáncer de ovario.

FIG. 1

1 AAQPARRARR TKLFTHRSSV STTSTPGTPT VYLGASKTPA SIFGPSAASH
 51 LLILFTLNFT ITNLYEENM WPGSRKFNTT ERVLOGLLRP LFKNTSVGPL
 101 YSGRLTLR PEKDEATGV DAICTHRPDP TGPGLDREQL YLELSQLTHS
 151 ITELGPYTLR RDSLYVNGFT HRSSVPTTST GVVSEEPFYL NFTINNLRYM
 201 ADMGQPGSLK FNITDNVMKE LLSPLFQRSS LGARYTGCRV IALRSVRMGA
 251 ETRVDLLCTY LQPLSGPGLP IKQVFHELSQ QTRGITRLGP YSLDKDSLVL
 301 MGYNEPGPDE PPTTPKPATT FLPLSEATT AMGYHLKTLT LNFTISNLQY
 351 SPDNGKGSAT FNSTEGVLQH LLRPLFKSS MGPFFYLGQOL ISLRPENGGA
 401 ATGVDTTCTY HPDEVGPGLD IQQLYNELSQ LTBGVTLQGF YVLDKDSLFI
 451 NGYAPONLSI RGEXOINFRV VNMNLSNRPD TSSEYITLLR DIODKYTTLX
 501 KGSOLHDTFR FCLVTNLNMD SVLYTVKALF SSNLDPSLVE QVFLDKTLNA
 551 SFRWLGSTYQ LVDIHYTEME SSVYOPTSSS STORFYLNFT LITLEYSODK
 601 AOPGTINXOR NKRNLIEDALM OLFERNSSIKS YFSDCOVSTF RSVENRHHTG
 651 YDSLGNFESL ARYDRVAIY EEFLEMTENG TOLONFTLDR SSVLVQGYFR
 701 NNNEPLTENS ADIQHSGGRS SLEGPRFQK LISEEDLNMH TGHHHHHH

FIG. 2

1 AAQFARRARR TKLETHRSSV STISTPGTET VYLGASKTPA SIFGSAASH
 51 LLILFTLNFT ITNLRYEEM WEGSRKFNIT ERVLOGLLRP LFKNTSVGPL
 101 YSGCLTLR PEKDGZATGV DAICTHRPDP TGEGLDRPOL YLELSOLTHS
 151 ITELGPXTLD RDSLYNGET HRSSVPTTST GVSSEFFTL NFKIANLRM
 201 ADMGQGSIK FNITDNVVKH LLSPLFORSS LGARYTGRV IALSVKKGA
 251 ETRVDLLCTY LQPLSGRGLR IKOVHELISO OTHGITRLGR YSLDKDSLXL
 301 NGYNERGEDE PPTPKRATT FLPLSRATT AMGVHKTET LNFILSNLOY
 351 SPDMGKSAT FNSTEGVLOH LRLPLFORSS MGFYIGCOL ISLRPEKGA
 401 ATGVDTTCTY HPDFVGRGLD IQOLYNELSO LTHGVTOIGF YVLDKDSLFT
 451 NGYAPONLSI RGEYQINEFI VNNLSNPDV TSSEYITLLR DIOQVTTLY
 501 KGSOLHDKER FCLVTNLTMD HYLVTVKALF SSNLDPSLVE QVELDKTINA
 551 SFHWLSTYO LVDIHYTEME SSVYOPTSSS STOHEYLNFT ITNLYSODK
 601 ADFGTTNYOR NKNIEDALN OLERNSSIKS YFSDCOVTF RSVPRHHTG
 651 VDSLNFSEL ARVDKVAIX EEFELRTRNG TOLONFTLDR SSVLVGKFF
 701 NRNEELTGNL DLPFNAVILI GLAGLGLIT CLICGLVIT BRKKEGEYN
 751 VQQCFTYQ SKLDLEDLON SADIQHSGR SSLEGPRFEQ KLISEDLNM
 801 KTGHHHHH

FIG. 3

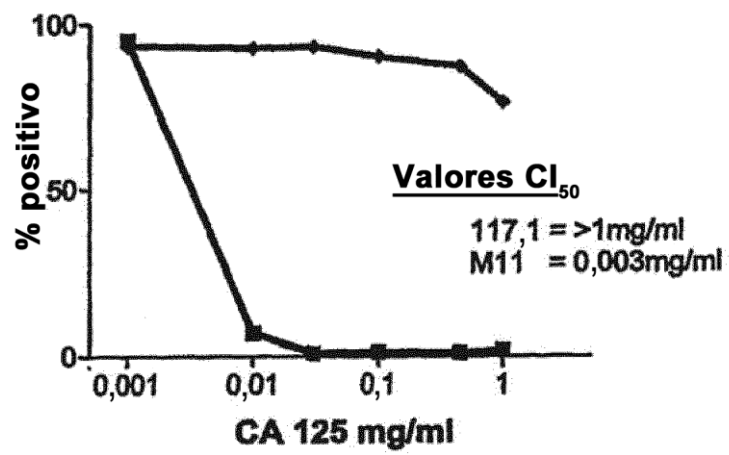


FIG. 4

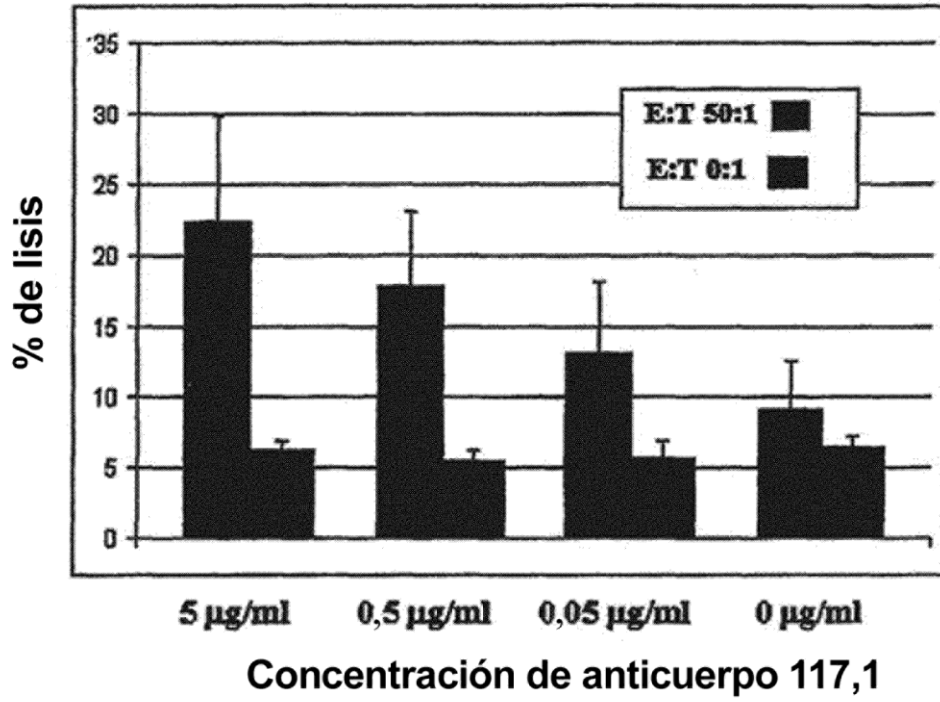


FIG. 5A

117.1 Cadena ligera:

ATGAAGTIGCCTGTTAGGCTGTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGGTCCAGCA
GTGATGCTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
GGCCTCCATCTCTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACC
TATTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAACCTCTGATCTACA
AAGTTTCCAACCGATTTCCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA GTGGCAGTGGATCAGG
GACAGATTCACACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTA
TTCTGCTCTCAAAGTAGATATGTTCCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTG
GAAATCAAA

FIG. 5B

117.1 Cadena pesada:

ATGGGCAGGCTTACTTCTTCATTCCCTGCTACTGATTGTCCCTGCATATGROCTGTC
CCAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTC
AGTCTGACTTGTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTCCTGGTATGGGGTAGG
CTGGATTCTGTCAGCCATCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTGGTG
GGATGATTTCAAGCCGATAATCCAGCCCTTAAGAGCCGACTGACTATCTCTAAG
GATACCTCCAGCAGCCAGGTTTTCTCAAATCGCCAGTGTGGACACTGCAGATA
CTGCCACATATTACTGTGTTGAGTGGATGGTAACTTCCCTCCTGGTATTTGAT
GTCTGGGGCGCTGGGACCACGGTACCGTCTCCTCA

FIG. 5C

117.1 Cadena ligera:

MKLPVRLLVLMFWIPGSSSDAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSOSLVHSNGNTYL
HWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRESGVPDRFSGSGSDFTLRISRVEAEDLGVYFCSQS
RYVPWIFGGGKLEIK

FIG. 5D

117.1 Cadena pesada:

MGRLTSSELLVLPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGESLSTPGMGVGVWIR
QPSGKGLEWLAHIWWDDEKRDNPALKSRLTISKDTSSSQVFLKIASVDTADTATYYC
VRVDGNELSWYEDYWGAGTTVTSS

FIG. 6A

368.1 cadena ligera:

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTCCAGCAG
TGATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAA
GCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGAACGCCTAATGGAAACACCT
ATTACATGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAACCTCTGATCTACAA
AGTTCCAGCCGATTTCTGGGGTCCCAGATAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGG
ACAGATTTCACTCAAGATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATT
TCTGTTCTCAAACCTACACATGGTCTCCGACGTGCGGTGGAGGCACCAAGCTGGA
AATCAAA

FIG. 6B

368.1 cadena pesada:

ATGGGATGGATCTGGATCTTCTCTTCCCTGTCAGGAACCTGCAGGTGTCCACTC
TGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTAGTGAGGACTGGGGCTTCAGT
GAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGTTTCTACATGCACTGG
GTCAAGCAGAGCCTTGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATGTTAGTTGTTACA
CTGGTGTACTACTACCCAGAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTTACTGTTGA
CACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGAAGACTCT
GCGGTCTATTACTGTGCAAGAGAAGGGGATTACTATTCTATGGACTTCTGGGGTC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

FIG. 6C

368.1 cadena ligera:

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSOSLERTNGNTYLH
WYLQKPGQSPKLLIYK~~VSSRFS~~GVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGIYFC~~SO~~TH
GPPTCGGGTKLEIK

FIG. 6D

368.1 cadena pesada:

MGWIWIEFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVRTGASVKISCKASGYSEFTGFYMHVV
KQSLGKSLIEWIGYVSCYTGATTY~~TOKFKG~~KATFTVDTSSSTAYMQLNSLTSEDSAVY
YCAREGDYYSMD~~FWGQ~~TSVTVSS

FIG. 7A

501.1 cadena ligera:

ATGGACATGAGGGCCCCTGCTCAGTTTTTIGGGATCTTGTGCTCTGGTTCCAGG
TATCAGATGTGACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCGTCCATTIATGCATCGCTG
GGAGAGAGGGTCACTATAACTTGCAAGGGCGAGTCAGGACATTAAGCTATTA
AGCTGGTACCAACAGAAACCTGGAATCTCCTAAGACCTGATCTATTATGCAA
CAACCTTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAG
ATTATTCTCTAATCATCAACAGCCTGGAGTCTGACGATATAGCTACTTATTTCTGT
CTACACCATGATGAGAGCCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAATTGAAATA
AA

FIG. 7B

501.1 cadena pesada:

ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTGTTTCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGCCCAAG
CACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAG
TCCAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATATCTTCACAGACTATGGAATGAACTG
GGTGAAACAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAATGGATGGGCTGTATAAACACCTA
CAGTGGAGAGACAATATATAGTATGACTTCAGGGGACGGTTTGCCATCTCTTG
GAAACCTCTGCCAGCACTGCCTTTATTTCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACG
CGGCAACATATTTCTGTGCAAGGGGAAATTACAGGGATGCTATGACTATTGGGG
TCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

FIG. 7C

501.1 cadena ligera:

MDMRAPAOFFGILLWEPGIRCDIKMTQSPSSIYASLGERVTTTCKASODIKSYLSWY
QQKFWKSPKTLIYYATTLADGVPSRFSGSGGQDYSLIINSLESDDIATYFCLHHDESP
ETFGSGTKLEI

FIG. 7D

501.1 cadena pesada:

MAWVWTLLELMAAAQSAQAQIQLVQSGPELKKPGETVQISCKASGYIFTDYGMNW
VKQAPGKGLKWMGCINTYTGETYSDDERGRFAISLETSASTAFIQINNLKNEDAATY
FCARGNYRDAIDYWGQGTSVTVSS

FIG. 8A

776.1 cadena ligera:

ATGGATTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAAT
GTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTTTGCATCTCCA
GGGAGACGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGTTC AAGTGTAATTTACATGTGT
GGAATCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCTGGATTTATGGCACATCCA
CCCTGGCTTCTGGAGTCCCTACTCGCTT CAGTGGCAGTGGGCTCTGGGACCTTTA
CTCTCTACAATCAGCAGAGTAGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAG
CAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTCCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAA

FIG. 8B

776.1 cadena pesada:

ATGGGATGGAGCTGGATCTTCTCTTCTCTCTGTCAGGAACTGCAGGGCTCCACT
CTGAGGTCAGCTTCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAACCTGGGGCCTCAG
TGAAGATATCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTACAACATTCACTG
GGTGAAACAGAGCCATGGAAAGATCCTTGAGTGGATTGGATATATTTATCCTTAT
AATGGTGTCTCTGACTACAACCAGAATTCAAGAGCAAGGCCACATTGATTGTAG
ACAATTCCTCCAACACAGCCTACATGGAACCTCCGACGCTGACATCTGAGGACTC
TGCAGTCTATTATTGTGCAAGATGGGACTTCGGTAGTGGCTACTACTTTGACTAC
TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCA

FIG. 8C

776.1 cadena ligera:

MDFQVOIESELLISASVIMSRGQIVLSQSPAILFASPGETVTMTCRASSSVIYMCWNQQ
KPGSSPKPWYGTSTLASGVPTFRSGSGSSTSYSLTISRVEAEDAATYYCOOWSSNEF
IFGSGTKLEI

FIG. 8D

776.1 cadena pesada:

MGWSWIELELLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTETDYNL
HWVKQSHGKILEWIGYIYPYNGVSDYNONEKSKATLIVDNSSNTAYMELRSLTSEDS
AVYYCARWDFGSGYYFDYWGQGTTLVSS

FIG. 9A

725.1 LC

ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTTCAGTCATAAT
GTCCAGAGGACAAATTATTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCA
GGGAGAAGGTACAAATGACTTGCAGGGCCAGTTCAAGTGTAAGTTCCATTAC
TGGTACCAGCAGAAGCCAGAATCCTCCCCAAACCCTGGATTACGCCACATCCA
ACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTAT
ACTCTACAATCAGCAGAATGGAGGCTGCAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGC
AGTGGAGTATTGATCCAGCCACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA

FIG. 9B

725.1 HC

ATGGCTTGGGTGIGGACCTTGCTATTCCIGATGGCAGCTGCCAAAGTGCCCAAG
CACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAAGTGAAGAAGCCTGGAGAGACAG
TCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCIGGATATTCCTTCACAAACTATGGAATGAACTG
GGTGAAGCAGGCTCCAGGGAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACGCCTA
CATTGGAGAGCCAACATATGCTGATGACTTCAAGGGACGATTGCTTCTCTCTG
GAAGCCTCTACCCACACTGCCTATTTGCAGATCAACAGCCTCAAAAAGTGAGGAC
ACGGCTACATATTTCTGTGCAAGTGGGGGTAAGTCCCTTGACTTTTGGGGCCAAG
GCACCACTCTCACAGTCTCCTCAG

FIG. 9C

725.1 LC

MDFOVOIESELLISASVIMSRGQILSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSSIHWYQQK
PESSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGGTSYTLTISRMEAADAATYYCQOWSIDPAT
FGGGTKLEI

FIG. 9D

725.1 HC

MAWVWTLLELMAAAOSAQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYSETNYGMNW
VKQAPGKGLKWMGWINAYIGEPTYADDEKGRFAFSLEASTHTAYLQINSLKSEDTA
TYFCASGGNSLDFWQGTTLVSS

FIG. 10A

16H9 LC

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAAT
GTCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTA
GGGGAACGGGTACCATGACCTGCAGTCCAGCTCAAGTGTAAGITCCAGTTACT
TGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACTCTGGATTATAGCAC
ATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACC
TCTTACTCTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACT
GCCACCAGTATCATCGTTCCCCATTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAAT
AAA

FIG. 10B

16H9 HC

ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAATT
CAGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAG
TCAAGTTGTCTGCACAGCTTCTGGCTCAACATTAAGACACCTATATGCACTG
GGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGC
GAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGC
AGACACATCCTCCAACACAGCCTACGTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA
CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGTAGTGACATCTACTATGGTAACCCCGGGGG
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

FIG. 10C

16H9 LC

MDEOVOIESELLISASVIMSRGQIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSVSSSYLHWY
QQKPGSSPKLWYSTSNLASGVPARFSGSGSTSYSLTISSMEAEDAATYYCHOYHRS
PTIFGSGTKLEI

FIG. 10D

16H9 HC

MKCSWVIEFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGENIKDTYMHW
VKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFOGKATTTADTSSNTAYVQLSSLTSEDYAV
YYCASSDIYYGNPGGFAYWGQGLVTVSA

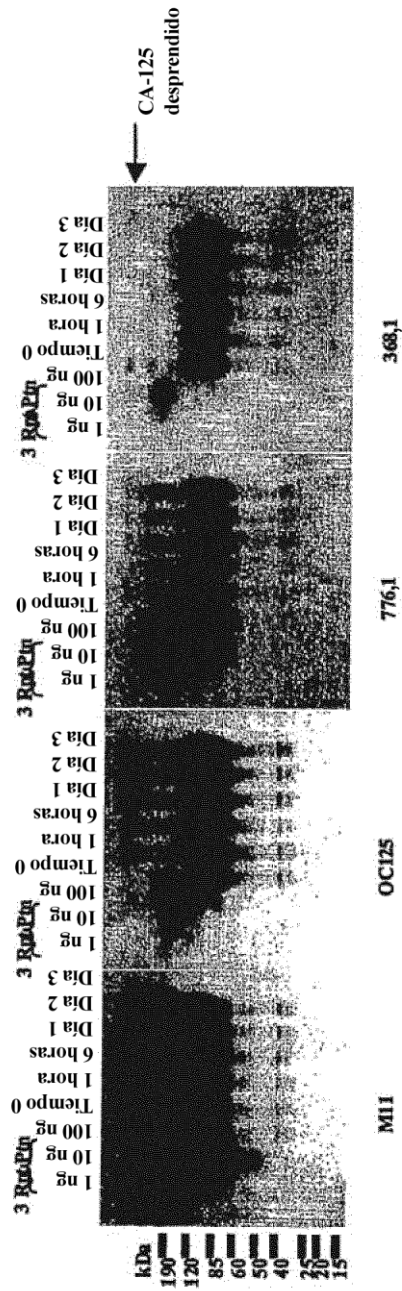


Figura 11

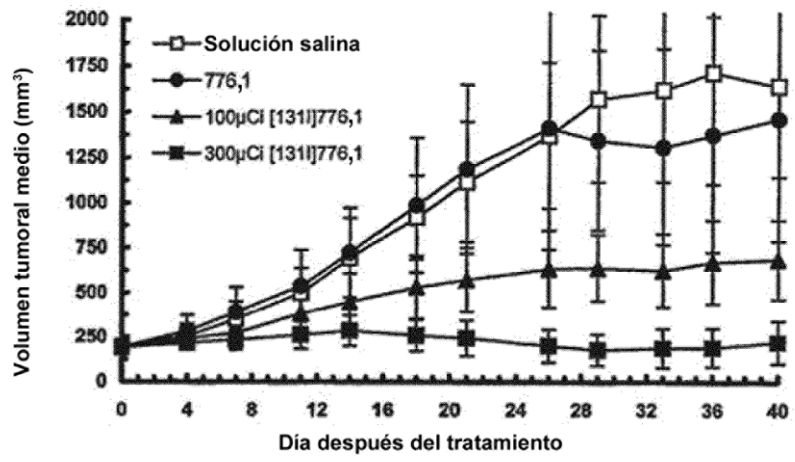


Figura 12