

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 737**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08010015 .9**  
96 Fecha de presentación: **22.01.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1975231**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **COMPOSICIÓN Y PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TERAPIA DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.**

30 Prioridad:  
**22.01.2002 US 57475**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.12.2011**

73 Titular/es:  
**CORIXA CORPORATION  
CSC THE UNITED STATES CORPORATION 2711  
CENTERVILLE ROAD  
WILMINGTON, DE 19808, US**

72 Inventor/es:  
**Gaiger, Alexander;  
Algate, Paul, A.;  
Mannion, Jane;  
Clapper, Jonathan, David;  
Wang, Aijun;  
Ordonez, Nadia;  
Carter, Lauren y  
McNeill, Patricia, Dianne**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 370 737 T3

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para la detección, diagnóstico y terapia de neoplasias hematológicas

### **1. Antecedentes de la invención**

#### **1.1 Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere en general a los campos de diagnóstico y terapia de cáncer. Más particularmente, se refiere al descubrimiento sorprendente de composiciones y procedimientos para la detección e inmunoterapia de neoplasias hematológicas y particularmente leucemias de linfocitos B y linfomas y mielomas múltiples. La invención proporciona nuevos procedimientos eficaces, composiciones y kits para inducir respuesta inmune y de linfocitos T a polipéptidos antigénicos y fragmentos peptídicos antigénicos aislados de los mismos y procedimientos para el uso  
10 de tales composiciones para diagnóstico, detección, tratamiento, control y/o prevención de diversos tipos de neoplasias hematológicas humanas. En particular, la invención proporciona compuestos polipeptídicos, peptídicos, de anticuerpos, de fragmentos de unión a antígenos, de hibridomas, de células huésped, de vectores y polinucleotídicos y composiciones para su uso en la identificación y diferenciación entre diversos tipos de neoplasias hematológicas y procedimientos para la detección, diagnóstico, pronóstico, control y terapia de tales afecciones en  
15 un animal afectado.

#### **1.2 Descripción de técnica relacionada**

##### **1.2.1 Neoplasias hematológicas**

Las neoplasias hematológicas, tales como leucemias y linfomas, son afecciones caracterizadas por crecimiento y maduración anómalas de células hematopoyéticas. Las leucemias son generalmente trastornos neoplásicos de  
20 células madre hematopoyéticas e incluyen leucemia mieloide aguda, pediátrica y adulta (AML), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia secundaria. Entre los linfomas, hay dos grupos diferenciados: linfoma no de Hodgkin (NHL) y enfermedad de Hodgkin. Los NHL son el resultado de una expansión clonal de linfocitos B o T, pero la patogenia molecular de la enfermedad de Hodgkin, incluyendo la derivación del linaje y clonalidad, sigue siendo desconocida. Otras neoplasias hematológicas incluyen  
25 síndromes mielodisplásicos (MDS), síndromes mieloproliferativos (MPS) y mieloma múltiple. Las neoplasias hematológicas son generalmente trastornos graves, que dan como resultado una diversidad de síntomas incluyendo insuficiencia de la médula ósea e insuficiencia de órganos.

Los NHL son la sexta causa más habitual de muertes relacionadas con cáncer en los Estados Unidos. Sólo los cánceres de próstata, mama, pulmón, colorrectal y de vejiga exceden actualmente al linfoma en la incidencia anual.  
30 En 1995, se diagnosticaron más de 45.000 nuevos NHL y más de 21.000 pacientes murieron de estas enfermedades. La edad media de los pacientes con linfoma es relativamente joven (42 años) y el número de años de vida perdidos resultantes por estas enfermedades hace a los NHL el cuarto en impacto económico entre los cánceres en los Estados Unidos. En los últimos 15 años, la Sociedad Americana del Cáncer indicó un aumento del 50 % en la incidencia de NHL, uno de los mayores aumentos para cualquier grupo de cáncer. Mucho de este  
35 aumento se ha atribuido al desarrollo de linfomas en hombres más jóvenes que han adquirido SIDA. Los linfomas también son la tercera causa más habitual de tumores malignos en la infancia y suponen aproximadamente el 10 % de cánceres en niños. La tasa de supervivencia (todas las edades) varía del 73 % (riesgo bajo) al 26 %.

##### **1.3 Deficiencias en la técnica anterior**

El tratamiento para muchas neoplasias hematológicas incluyendo leucemias y linfomas, sigue siendo difícil y las  
40 terapias existentes no son universalmente eficaces. Aunque los tratamientos que implican inmunoterapia específica parecen tener potencial considerable, tales tratamientos se han limitado por el pequeño número de antígenos asociados con tumores malignos conocidos. Además la capacidad para detectar tales neoplasias hematológicas en sus etapas tempranas puede ser bastante difícil dependiendo de la enfermedad particular. La falta de un número  
45 suficiente de marcadores de diagnóstico y pronóstico específicos de las enfermedades y la identificación de células y tejidos que pueden verse afectados, ha limitado significativamente el campo de la oncología

En consecuencia, sigue existiendo una necesidad de la técnica de procedimientos mejorados de detección, exploración, diagnóstico y tratamiento de neoplasias hematológicas tales como leucemias y linfomas de linfocitos B y mielomas múltiples. La presente invención satisface estas y otras necesidades inherentes en el campo y proporciona  
50 ventajas significativas en la detección de células y tipos celulares que expresan uno o más polipéptidos que se ha mostrado que se sobreexpresan en uno o más de tales neoplasias hematológicas.

### **2. Sumario de la invención**

La presente invención se dirige a la anterior necesidad sentida durante mucho tiempo y otras deficiencias en la técnica identificando nuevas y eficaces estrategias para la identificación, detección, exploración, diagnóstico,  
55 pronóstico, profilaxis, terapia e inmunomodulación de uno o más tumores hematológicos y, en particular, leucemias y linfomas de linfocitos B y mielomas múltiples.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que se ha identificado ahora que ciertos polipéptidos, péptidos, y fragmentos antigénicos derivados de los mismos, humanos no identificados o previamente desconocidos se sobreexpresan en uno o más tipos de neoplasias hematológicas. Los genes que codifican varios de estos polipéptidos se identifican y obtienen ahora en forma aislada y se han caracterizado usando una serie de metodologías de biología molecular incluyendo análisis de biblioteca de sustracción, exploración de microseries, secuenciación de polinucleótidos, identificación y caracterización de péptidos y epitópica, así como realización de perfiles de expresión y estimulación de células con gen completo *in vitro*. Un conjunto de estos polinucleótidos, y los polipéptidos, péptidos y fragmentos antigénicos que codifican no están identificados e implicados en los complejos procesos de aparición, progresión y/o resultado de enfermedad maligna hematológica y, en particular, enfermedades tales como leucemias y linfomas. La presente invención se refiere al uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia expuesta SEC ID N°: 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (CLL) o mieloma múltiple (MM) en un sujeto mamífero.

Los inventores han demostrado adicionalmente que varios de estos polinucleótidos y sus polipéptidos codificados, así como anticuerpos, células presentadoras de antígenos, linfocitos T y los fragmentos de unión a antígeno derivados de tales anticuerpos son útiles en el desarrollo de composiciones y procedimientos particularmente ventajosos para la detección, diagnóstico, pronóstico, profilaxis y/o terapia de una o más de estas enfermedades y particularmente las afecciones que se caracterizan por (a) una expresión aumentada, alterada, elevada o prolongada de uno o más polinucleótidos que comprenden al menos una región de primera secuencia que comprende una secuencia de ácido nucleico como se desvela en una de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118, ó 124 o (b) una actividad biológica aumentada, alterada, elevada o prolongada de uno o más polipéptidos que comprende al menos una primera región de secuencia que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121.

La presente invención también proporciona procedimientos y usos para una o más de las composiciones peptídicas, polipeptídicas, de anticuerpos, de fragmentos de unión a antígeno y polinucleótidas desveladas de la presente invención en la generación de una respuesta inmune o en la generación de una respuesta a linfocitos T en un animal y en particular en un mamífero tal como un ser humano. La invención también proporciona procedimientos y usos para una o más de estas composiciones en la identificación detección y cuantificación de composiciones de neoplasias hematológicas en muestras clínicas, células aisladas, tejidos completos e incluso individuos afectados. Las composiciones y procedimientos desvelados en el presente documento también pueden usarse en la preparación de uno o más reactivos de diagnóstico, ensayos, medicamentos o agentes terapéuticos para diagnóstico y/o terapia de tales enfermedades.

En un primer aspecto, se describe una composición que comprende al menos un primer péptido o polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121. Son secuencias preferidas ejemplares descritas en el presente documento las que comprenden al menos una primera región codificante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, o aproximadamente 94 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121, siendo las secuencias que comprenden al menos una primera región codificante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61,

63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121 ejemplos de secuencias particularmente preferidas en la práctica de la presente invención. De forma similar, también se describen compuestos peptídicos y polipeptídicos y composiciones que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121.

De forma similar, también se desvelan en el presente documento composiciones y procedimientos para la detección, diagnóstico, pronóstico, profilaxis, tratamiento y terapia de leucemia de linfocitos B, linfoma y mieloma múltiple. Los compuestos y composiciones peptídicos y polipeptídicos preferidos ejemplares incluyen, pero sin limitación, los compuestos o composiciones peptídicos y polipeptídicos que comprenden al menos un primer péptido o polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121, y las que comprenden al menos una primera región codificante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, o aproximadamente 94 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121 e incluso las secuencias que comprenden al menos una primera región codificante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121.

Los péptidos ejemplares desvelados en el presente documento pueden ser de cualquier longitud adecuada, dependiendo de la aplicación particular del mismo y abarcan los péptidos que son de aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95 o aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. Por supuesto, los péptidos también pueden abarcar cualquier longitud intermedia o números enteros dentro de los intervalos indicados.

Los polipéptidos y proteínas ejemplares desvelados en el presente documento pueden ser de cualquier longitud adecuada, dependiendo de la aplicación particular de los mismos y abarcan los polipéptidos y proteínas que son de aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350 o aproximadamente 400 aminoácidos de longitud. Por supuesto, los polipéptidos y proteínas de la invención pueden abarcar también cualquier longitud intermedia o números enteros dentro de los intervalos indicados.

Los péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención preferentemente comprenderán una secuencia de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 aminoácidos contiguos de uno cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121.

Además, los polipéptidos, proteínas, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención comprenderán aún más preferentemente al menos una primera región codificante aislada que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 ó 200 aminoácidos contiguos de uno cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-

17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121.

- 5 De forma similar, los polipéptidos, proteínas, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden comprender al menos una primera región codificante aislada que comprende una secuencia sustancialmente más larga, tal como por ejemplo, una de al menos aproximadamente 200, 220, 240, 260, 280 de 300 o más aminoácidos contiguos de uno cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16, 17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121.

15 En realizaciones ilustrativas y particularmente en las realizaciones que se refieren a procedimientos y composiciones relacionados con leucemias de linfocitos B, linfomas y mielomas múltiples, los polipéptidos de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos que (a) comprende, (b) consiste esencialmente en o (c) consiste en, la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121.

25 Los polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento preferentemente comprenden una secuencia de aminoácidos que se codifica por al menos un primer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de al menos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos contiguos de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124.

30 Los polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento también comprenden preferentemente una secuencia de aminoácidos codificada por al menos un primer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40 nucleótidos contiguos de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124. Los polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento también pueden comprender preferentemente una o más regiones codificantes que comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por al menos un primer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 nucleótidos contiguos de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124. Los polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento también pueden comprender preferentemente una o más regiones codificantes que comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por al menos un primer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 ó 60 nucleótidos contiguos de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124. Los polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento también pueden comprender preferentemente una o más regiones codificantes que comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por al menos un primer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ó 150 nucleótidos contiguos de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124. Los polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento también pueden comprender preferentemente una o más regiones codificantes que comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por al menos un primer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 ó 400 nucleótidos contiguos de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124. Los polipéptidos y proteínas descritos en el presente documento también pueden comprender preferentemente una o más regiones codificantes que comprenden una secuencia de aminoácidos codificada por al menos un primer segmento de ácido nucleico que comprende una secuencia de al menos aproximadamente 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 ó 1500 nucleótidos contiguos de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124.

60 En una segunda realización importante, se describe una composición que comprende al menos un primer polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o 100 %.

aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124. Son secuencias preferidas ejemplares las que comprenden una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, o aproximadamente 94 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124, siendo las secuencias que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico que es al menos aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 ejemplos de secuencias particularmente preferidas.

En realizaciones que se refieren particularmente a composiciones y procedimientos para la detección, diagnóstico, pronóstico, profilaxis, tratamiento y terapia de leucemia de linfocitos B, linfomas y mielomas múltiples. Las composiciones polinucleotídicas preferidas ejemplares incluyen las composiciones que comprenden al menos un primer segmento de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que es al menos aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124. Tales polinucleótidos preferentemente comprenderán una o más regiones codificantes aisladas, cada una de las cuales puede (a) comprender, (b) consistir esencialmente en o (c) consistir en, la secuencia de ácido nucleico de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124.

Los polinucleótidos ejemplares descritos en el presente documento pueden ser de cualquier longitud adecuada, dependiendo de la aplicación particular de los mismos, y abarcan los polinucleótidos que (a) son al menos aproximadamente o (b) comprenden al menos un primer segmento de ácido nucleico aislado que es al menos aproximadamente de 27, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 540, 560, 580, 600, 625, 650, 675, 700, 750, 800, 850, 900, 950 ó 1000 ácidos nucleicos de longitud, así como polinucleótidos más largos que (a) son de al menos aproximadamente o (b) comprenden al menos un primer segmento de ácido nucleico aislado que es de al menos aproximadamente 1000, 1025, 1050, 1075, 1100, 150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 ó 3000 ácidos nucleicos de longitud, así como polinucleótidos sustancialmente más grandes. Por supuesto, los polinucleótidos y segmentos de ácido nucleico descritos en el presente documento también pueden abarcar cualquier longitud intermedia o números enteros dentro de los intervalos indicados.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden comprender un polipéptido o polinucleótido sencillo o, como alternativa, pueden comprender dos o más de tales compuestos de neoplasias hematológicas, tales como, por ejemplo, dos o más polipéptidos, dos o más polinucleótidos o incluso combinaciones de uno o más péptidos o polipéptidos, junto con uno o más polinucleótidos. Cuando se contemplan dos o más polipéptidos para aplicaciones particulares, el segundo, tercero y/o cuarto, etc. péptidos y/o polipéptidos aislados comprenderán preferentemente una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 91 %, 93 %, 95 %, 97 % ó 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelada en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121. Como alternativa, los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden comprender una o más regiones codificantes que codifican una primera proteína o péptido de fusión, tal como una región que codifica adyuvante fusionada en fase de lectura correcta con uno o más de los péptidos o polipéptidos de tumor maligno hematológico desvelados. Como alternativa, la proteína de fusión puede comprender un polipéptido o péptido de tumor maligno hematológico fusionado, en fase de lectura correcta, con una proteína o péptido detectable o con una proteína o péptido inmunostimulante u otra construcción tal. Las proteínas de fusión tales como estas son particularmente útiles en las realizaciones que se refieren a diagnóstico, detección y terapia de

uno o más de los tumores hematológicos analizados en el presente documento.

5 También se describe una composición que comprende al menos una primera línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que tiene inmunoespecificidad para uno o más de los péptidos o polipéptidos desvelados en el presente documento o al menos un primer anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene inmunoespecificidad para un péptido o polipéptido tal. Los fragmentos de unión a antígeno pueden comprender una región variable de cadena ligera, una región variable de cadena pesada, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)<sub>2</sub>, un fragmento Fv, un fragmento scFv o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo tal.

10 También se describe una composición que comprende al menos una primera célula presentadora de antígenos aislada que expresa un péptido o polipéptido como se desvela en el presente documento, o una pluralidad de linfocitos T aislados que reaccionan específicamente con un péptido o polipéptido tal. Tales pluralidades de linfocitos T aislados pueden estimularse o expandirse por contacto de los linfocitos T con uno o más péptidos o polipéptidos como se describe en el presente documento. Los linfocitos T pueden clonarse antes de la expansión y pueden obtenerse de médula ósea, una fracción de médula ósea, sangre periférica o una fracción de sangre periférica de un mamífero sano o de un mamífero que está aquejado de al menos un primer tumor maligno hematológico tal como leucemia o linfoma.

15 Como se ha descrito anteriormente los polipéptidos aislados pueden ser del orden de 9 a aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud o, como alternativa, pueden ser del orden de 50 a aproximadamente 900 aminoácidos de longitud, de 75 a aproximadamente 800 aminoácidos de longitud, de 100 a aproximadamente 700 aminoácidos de longitud o de 125 a aproximadamente 600 aminoácidos de longitud o cualquier otro intervalo adecuado tal.

20 Los segmentos de ácido nucleico aislados que codifican tales polipéptidos aislados pueden ser del orden de 27 a aproximadamente 10,000 nucleótidos de longitud, de 150 a aproximadamente 8000 nucleótidos de longitud, de 250 a aproximadamente 6000 nucleótidos de longitud, de 350 a aproximadamente 4000 nucleótidos de longitud, o de 450 a aproximadamente 2000 nucleótidos de longitud o cualquier otro intervalo adecuado tal.

25 El segmento de ácido nucleico puede posicionarse operativamente bajo el control de al menos un primer promotor recombinante heterólogo, tal como un promotor específico de tejido, específico de célula, inducible o regulado de otro modo. Tales promotores pueden controlarse o regularse adicionalmente por la presencia de uno o más potenciadores o regiones reguladoras adicionales dependiendo del tipo celular particular en el que se desea la expresión del polinucleótido. Los polinucleótidos y segmentos de ácido nucleico descrito en el presente documento también pueden comprenderse dentro de un vector, tal como un plásmido o un vector viral. Los polipéptidos y polinucleótidos descritos en el presente documento también pueden comprenderse dentro de una célula huésped, tal como una célula huésped recombinante o una célula huésped humana tal como una célula de médula ósea o sanguínea.

30 Los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden comprender al menos un primer segmento de ácido nucleico aislado unido operativamente, en fase, a al menos un segundo fragmento de ácido nucleico aislado de modo que el polinucleótido codifica una proteína de fusión en la que el primer péptido o polipéptido está ligado al segundo péptido o polipéptido.

35 Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender un aminoácido contiguo de cualquier longitud adecuada, tal como por ejemplo, los de aproximadamente 2000, aproximadamente 1900, aproximadamente 1850, aproximadamente 1800, aproximadamente 1750, aproximadamente 1700, aproximadamente 1650, aproximadamente 1600, aproximadamente 1550, aproximadamente 1500, aproximadamente 1450, aproximadamente 1400, aproximadamente 1350, aproximadamente 1300, aproximadamente 1250, aproximadamente 1200, aproximadamente 1150, aproximadamente 1100 aminoácidos o aproximadamente 1000 de longitud. De forma similar, los polipéptidos y péptidos descritos en el presente documento pueden comprender regiones codificantes de aminoácidos contiguos ligeramente más cortas, tales como por ejemplo, las de aproximadamente 950, aproximadamente 900, aproximadamente 850, aproximadamente 800, aproximadamente 750, aproximadamente 700, aproximadamente 650, aproximadamente 600, aproximadamente 550, aproximadamente 500, aproximadamente 450, aproximadamente 400, aproximadamente 350, aproximadamente 300, aproximadamente 250, aproximadamente 200, aproximadamente 150 o incluso aproximadamente 100 aminoácidos de longitud.

40 De forma similar, los polipéptidos y péptidos descritos en el presente documento pueden comprender regiones codificantes de aminoácidos contiguos aún más pequeños, tales como por ejemplo, las de aproximadamente 95, aproximadamente 90, aproximadamente 85, aproximadamente 80, aproximadamente 75, aproximadamente 70, aproximadamente 65, aproximadamente 60, aproximadamente 55, aproximadamente 50, aproximadamente 45, aproximadamente 40, aproximadamente 35, aproximadamente 30, aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, o incluso aproximadamente 9 aminoácidos de longitud.

En todas las realizaciones tales, se contemplan todos los péptidos y polipéptidos que tienen longitudes intermedias incluyendo todos los números enteros dentro de los intervalos preferidos (por ejemplo, los péptidos y polipéptidos que comprenden al menos una primera región codificante de al menos aproximadamente 94, aproximadamente 93,

aproximadamente 92, aproximadamente 91, aproximadamente 89, aproximadamente 88, aproximadamente 87, aproximadamente 86, aproximadamente 84, aproximadamente 83, aproximadamente 82, aproximadamente 81, aproximadamente 79, aproximadamente 78, aproximadamente 77, aproximadamente 76, aproximadamente 74, aproximadamente 73, aproximadamente 72, aproximadamente 71, aproximadamente 69, aproximadamente 68, aproximadamente 67, aproximadamente 66 aminoácidos de longitud, etc.).

En realizaciones particulares, los péptidos y polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender una secuencia de al menos aproximadamente 9, o aproximadamente 10, o aproximadamente 11, o aproximadamente 12, o aproximadamente 13, o aproximadamente 14, o aproximadamente 15, o aproximadamente 16, o aproximadamente 17, o aproximadamente 18, o aproximadamente 19, o aproximadamente 20, o aproximadamente 21, o aproximadamente 22, o aproximadamente 23, o aproximadamente 24, o aproximadamente 25, o aproximadamente 26, o aproximadamente 27, o aproximadamente 28, o aproximadamente 29, o aproximadamente 30, o aproximadamente 31, o aproximadamente 32, o aproximadamente 33, o aproximadamente 34, o aproximadamente 35, o aproximadamente 36, o aproximadamente 37, o aproximadamente 38, o aproximadamente 39, o aproximadamente 40, o aproximadamente 41, o aproximadamente 42, o aproximadamente 43, o aproximadamente 44, o aproximadamente 45, o aproximadamente 46, o aproximadamente 47, o aproximadamente 48, o aproximadamente 49 o aproximadamente 50 aminoácidos contiguos como se desvela en uno o más cualesquiera de los péptidos purificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121 en el presente documento.

En otras realizaciones, los péptidos y polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender una secuencia de al menos aproximadamente 51, o aproximadamente 52, o aproximadamente 53, o aproximadamente 54, o aproximadamente 55, o aproximadamente 56, o aproximadamente 57, o aproximadamente 58, o aproximadamente 59, o aproximadamente 60, o aproximadamente 61, o aproximadamente 62, o aproximadamente 63, o aproximadamente 64, o aproximadamente 65, o aproximadamente 66, o aproximadamente 67, o aproximadamente 68, o aproximadamente 69, o aproximadamente 70, o aproximadamente 71, o aproximadamente 72, o aproximadamente 73, o aproximadamente 74, o aproximadamente 75, o aproximadamente 76, o aproximadamente 77, o aproximadamente 78, o aproximadamente 79, o aproximadamente 80, o aproximadamente 81, o aproximadamente 82, o aproximadamente 83, o aproximadamente 84, o aproximadamente 85, o aproximadamente 86, o aproximadamente 87, o aproximadamente 88, o aproximadamente 89, o aproximadamente 90, o aproximadamente 91, o aproximadamente 92, o aproximadamente 93, o aproximadamente 94, o aproximadamente 95, o aproximadamente 96, o aproximadamente 97, o aproximadamente 98, o aproximadamente 99 o 100 aminoácidos contiguos como se desvela en uno o más cualesquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121 en el presente documento.

En otras realizaciones más, los péptidos y polipéptidos preferidos descritos en el presente documento comprenden una secuencia de al menos aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375 ó 400 o más aminoácidos contiguos como se desvela en uno cualquiera o más de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121 en el presente documento.

Un polipéptido sencillo puede contener solamente una región codificante sencilla o, como alternativa, un polipéptido sencillo puede comprender una pluralidad de secuencias de aminoácidos contiguos idénticas o claramente diferentes de acuerdo con uno cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121. De hecho, el polipéptido puede comprender una pluralidad de las mismas secuencias de aminoácidos contiguos o puede comprender una o más secuencias de aminoácidos contiguos diferentes de cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121. Por ejemplo, un polipéptido sencillo puede comprender una secuencia de aminoácidos contiguos sencilla de uno o más de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103,



105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID Nº: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121, o, como alternativa, puede comprender dos o más secuencias de aminoácidos contiguos claramente diferentes de uno o más de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID Nº: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID Nº: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121. De hecho, el polipéptido puede comprender 2, 3, 4, o incluso 5 secuencias de aminoácidos contiguos definidas de uno cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID Nº: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID Nº: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121. Como alternativa, un polipéptido sencillo puede comprender 2, 3, 4, o incluso 5 regiones codificantes definidas. Por ejemplo, un polipéptido puede comprender al menos una primera región codificante que comprende una primera secuencia de aminoácidos contiguos de uno cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID Nº: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID Nº: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121, y al menos una segunda región codificante que comprende una segunda secuencia de aminoácidos contiguos de uno cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID Nº: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID Nº: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121. Por el contrario, un polipéptido puede comprender al menos una primera región codificante que comprende una primera secuencia de aminoácidos contiguos de uno cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID Nº: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desvelados en una cualquiera de SEC ID Nº: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121, y al menos una segunda región codificante que comprende un segundo péptido o polipéptido claramente diferente, tal como por ejemplo, un adyuvante o un péptido o polipéptido inmunostimulante.

En tales casos, las dos regiones codificantes pueden estar separadas en el mismo polipéptido o las dos regiones codificantes pueden estar unidas operativamente, cada una en la fase de lectura correcta, de modo que se produce un polipéptido de fusión en el que la primera secuencia de aminoácidos de la primera región codificante está ligada a la segunda secuencia de aminoácidos de la segunda región codificante.

A lo largo de presente divulgación, se pretende que una frase tal como “una secuencia como se desvela en SEC ID Nº: 1 a SEC ID Nº: 4” abarque todas y cada una de las secuencias contiguas desveladas por uno cualquiera de estos identificadores de secuencia. Es decir, “una secuencia como se desvela en cualquiera de SEC ID Nº: 1 a SEC ID Nº: 4” significa cualquiera secuencia que se desvela en una cualquiera de SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, o SEC ID Nº: 4. De forma similar, “una secuencia como se desvela en cualquiera de SEC ID Nº: 25 a 37” significa cualquier secuencia que se desvele en una cualquiera de SEC ID Nº: 25, SEC ID Nº: 26, SEC ID Nº: 27, SEC ID Nº: 28, SEC ID Nº: 29, SEC ID Nº: 30, SEC ID Nº: 31, SEC ID Nº: 32, SEC ID Nº: 33, SEC ID Nº: 34, SEC ID Nº: 35, SEC ID Nº: 36, o SEC ID Nº: 37, y así sucesivamente.

De forma similar, se pretende que una frase tal como “al menos una primera secuencia de una cualquiera de SEC ID Nº: 55 a SEC ID Nº: 62” se refiera a una primera secuencia que se desvela en una cualquiera de SEC ID Nº: 55, SEC ID Nº: 56, SEC ID Nº: 57, SEC ID Nº: 58, SEC ID Nº: 59, SEC ID Nº: 60, SEC ID Nº: 61, o SEC ID Nº: 62.

También se entenderá que los kits y composiciones de la presente invención comprenden en un sentido global y general al menos uno o más polinucleótidos, polipéptidos y péptidos particulares que comprenden una o más regiones de secuencias contiguas de una o más de las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento en SEC ID Nº: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o de una o más de las secuencias de aminoácidos codificadas por una cualquiera de SEC ID Nº: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o desveladas en una cualquiera de SEC ID Nº: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121 y que dichas composiciones peptídicas, polipeptídicas y polinucleotídicas pueden usarse en uno o más de los procedimientos y usos particulares desvelados en el presente documento para el diagnóstico, detección, profilaxis y terapia de uno o más cánceres hematológicos y, en particular, linfomas de una diversidad de tipos específicos. También se entenderá por el experto en la materia que tenga el beneficio de las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, que las composiciones peptídicas y polipeptídicas pueden usarse para generar una respuesta inmune o de linfocitos T en un

animal y que tales composiciones también pueden administrarse a un animal del que pueden aislarse o identificarse anticuerpos y fragmentos de un antígeno inmunoespecíficos que se unen específicamente a tales péptidos o polipéptidos. Un experto en la materia tal también reconocerá que los polinucleótidos identificados por la presente divulgación pueden usarse para producir tales péptidos, polipéptidos, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, por metodologías de producción de proteína recombinante que también están dentro de la capacidad del experto en la materia que tenga el beneficio de las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico específicas proporcionadas en el presente documento.

De forma similar, se entenderá por un experto en el campo, que una o más de las composiciones desveladas pueden usarse en una o más metodologías de diagnóstico o detección para identificar ciertos anticuerpos, péptidos, polinucleótidos o polipéptidos en una muestra biológica, en una célula huésped o incluso dentro del cuerpo o tejidos de un animal. Se entenderá por un experto en el campo, que una o más de las composiciones de aminoácidos o ácidos nucleicos desveladas pueden usarse en la preparación o fabricación de uno o más medicamentos para su uso en el diagnóstico, detección, pronóstico, profilaxis o terapia de uno o más neoplasias hematológicas en un animal y particularmente las afecciones malignas desveladas y reivindicadas en el presente documento.

También será fácilmente evidente para los expertos en la materia, que los procedimientos, kits y usos de la presente invención preferentemente emplean uno o más de los compuestos o composiciones desvelados en el presente documento que comprenden una o más secuencias de nucleótidos contiguos como pueden presentarse en SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16, 17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 de la lista de secuencias adjunta.

De forma similar, resultará fácilmente evidente para los expertos en la materia, que los procedimientos, kits y usos de la presente invención también pueden emplear uno o más de los compuestos y composiciones desvelados en el presente documento que comprenden una o más secuencias de aminoácidos contiguos de cualquiera de los péptidos codificados por una cualquiera de SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33-34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 93, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 o presentados en una cualquiera de SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121 de la lista de secuencias adjuntas. En una realización se proporciona un procedimiento para la detección de leucemia linfocítica crónica (CLL) o mieloma múltiple (MM) en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento: a) poner en contacto una muestra biológica del paciente con un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 4, por lo que dicho anticuerpo monoclonal forma un complejo con un polipéptido que comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 4; y b) detectar la cantidad de dicho complejo, detectando de este modo cáncer en un paciente.

#### **Breve descripción de los dibujos y secuencias**

La invención puede entenderse por referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que números de referencia similares identifican elementos similares y en los que:

La **FIGURA 1** ilustra un perfil esquemático del enfoque de tecnología de microplaca de microseries usado para identificar las dianas de ADNc de la presente invención como se describe en la Sección 5:1.

La **FIGURA 2** ilustra un perfil esquemático del protocolo general para procedimiento de sensibilización de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de gen completo *in vitro* usado para generar líneas específicas de antígeno y para identificar clones de interés.

La **FIGURA 3** ilustra un perfil esquemático del protocolo general para procedimiento de sensibilización de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de gen completo *in vitro* usado para generar líneas específicas de antígeno y para identificar clones de interés.

La **FIGURA 4** ilustra el panel de sondas usadas para identificar ADNc que se sobreexpresan en células de linfoma.

La **FIGURA 5** enumera los antígenos que tienen perfiles de expresión tisular similares a los agentes terapéuticos conocidos CD20 y CD52.

La **FIGURA 6** ilustra los resultados del informe de TMpred para Ly1484 largo y Ly1484 corto.

La **FIGURA 7** ilustra los resultados del análisis de TSITES de Ly1484 largo.

La **FIGURA 8** ilustra los resultados del análisis de TSITES de Ly1484 corto.

**SEC ID N°: 1** es un ADNc de longitud completa para Ly1728P.

**SEC ID N°: 2** es una secuencia de proteína de longitud completa para Ly1728P.

**SEC ID N°: 3** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1732P.

**SEC ID N°: 4** es una proteína de longitud completa de Ly1732P.

## ES 2 370 737 T3

- SEC ID Nº: 5** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1888P.
- SEC ID Nº: 6** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1888P.
- SEC ID Nº: 7** es una secuencia de ADNc de longitud completa de fusión Ly1452\_marcador His.
- SEC ID Nº: 8** es una secuencia de proteína de longitud completa de fusión Ly1452\_marcador His.
- 5 **SEC ID Nº: 9** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1452P, variante de corte y empalme 1.
- SEC ID Nº: 10** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1452P, variante de corte y empalme 1.
- SEC ID Nº: 11** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1452P, variante de corte y empalme 2.
- SEC ID Nº: 12** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1452P, variante de corte y empalme 2.
- SEC ID Nº: 13** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1462P.
- 10 **SEC ID Nº: 14** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1462P.
- SEC ID Nº: 15** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1462P.
- SEC ID Nº: 16** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1484P.
- SEC ID Nº: 17** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1484P.
- SEC ID Nº: 18** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1484P.
- 15 **SEC ID Nº: 19** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1486P.
- SEC ID Nº: 20** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1486P.
- SEC ID Nº: 21** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1486P.
- SEC ID Nº: 22** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1677P.
- SEC ID Nº: 23** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1682P.
- 20 **SEC ID Nº: 24** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1693P.
- SEC ID Nº: 25** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1693P.
- SEC ID Nº: 26** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1693P.
- SEC ID Nº: 27** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1697P.
- SEC ID Nº: 28** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1715P.
- 25 **SEC ID Nº: 29** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1715P.
- SEC ID Nº: 30** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1727P.
- SEC ID Nº: 31** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1727P..
- SEC ID Nº: 32** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1727P.
- SEC ID Nº: 33** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1885P.
- 30 **SEC ID Nº: 34** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1885P.
- SEC ID Nº: 35** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1885P.
- SEC ID Nº: 36** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1905P.
- SEC ID Nº: 37** es una secuencia de proteína parcial de Ly1905P.
- SEC ID Nº: 38** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1905P.
- 35 **SEC ID Nº: 39** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1905P.
- SEC ID Nº: 40** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1905P.
- SEC ID Nº: 41** es una secuencia de ADNc parcial de Ly663S.

## ES 2 370 737 T3

- SEC ID Nº: 42** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly663S.
- SEC ID Nº: 43** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly663S.
- SEC ID Nº: 44** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly664S.
- SEC ID Nº: 45** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly664S.
- 5 **SEC ID Nº: 46** es una secuencia de ADNc parcial de Ly667S.
- SEC ID Nº: 47** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly667S.
- SEC ID Nº: 48** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly667S.
- SEC ID Nº: 49** es una secuencia de ADNc parcial de Ly677S.
- SEC ID Nº: 50** es una secuencia de proteína parcial de Ly677S.
- 10 **SEC ID Nº: 51** es una secuencia de ADNc parcial de Ly677S.
- SEC ID Nº: 52** es una secuencia de proteína parcial de Ly677S.
- SEC ID Nº: 53** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly677S.
- SEC ID Nº: 54** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly677S.
- SEC ID Nº: 55** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1891P.
- 15 **SEC ID Nº: 56** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1891P.
- SEC ID Nº: 57** es una secuencia de ADNc de longitud completa de CD138.
- SEC ID Nº: 58** es una secuencia de proteína de longitud completa de CD138.
- SEC ID Nº: 59** es una secuencia de ADNc parcial de CD22.
- SEC ID Nº: 60** es una secuencia de ADNc de longitud completa de CD22.
- 20 **SEC ID Nº: 61** es una secuencia de proteína de longitud completa de CD22.
- SEC ID Nº: 62** es una secuencia de ADNc parcial de CD79beta.
- SEC ID Nº: 63** es una secuencia de proteína parcial de CD79beta.
- SEC ID Nº: 64** es una secuencia de ADNc parcial de CD79beta.
- SEC ID Nº: 65** es una secuencia de ADNc de longitud completa de CD79beta.
- 25 **SEC ID Nº: 66** es una secuencia de proteína de longitud completa de CD79beta.
- SEC ID Nº: 67** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1450P.
- SEC ID Nº: 68** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1450P.
- SEC ID Nº: 69** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1451P.
- SEC ID Nº: 70** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1451P.
- 30 **SEC ID Nº: 71** es una secuencia de proteína parcial de Ly1451P.
- SEC ID Nº: 7272>Ly1454P, Antiguo-SEC-ID\_3577, ADNc parcial**
- SEC ID Nº: 73** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1454P.
- SEC ID Nº: 74** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1454P.
- SEC ID Nº: 75** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1485P.
- 35 **SEC ID Nº: 76** es una secuencia de proteína parcial de Ly1485P.
- SEC ID Nº: 77** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1485P.
- SEC ID Nº: 78** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1500P.

- SEC ID Nº: 79** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1500P, variante de corte y empalme 1.
- SEC ID Nº: 80** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1500P, variante de corte y empalme 1.
- SEC ID Nº: 81** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1500P, variante de corte y empalme 2.
- SEC ID Nº: 82** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1500P, variante de corte y empalme 2.
- 5 **SEC ID Nº: 83** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1500P, variante de corte y empalme 3.
- SEC ID Nº: 84** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1500P, variante de corte y empalme 3.
- SEC ID Nº: 85** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1516P.
- SEC ID Nº: 86** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1516P, variante de corte y empalme 1.
- SEC ID Nº: 87** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1516P, variante de corte y empalme 1.
- 10 **SEC ID Nº: 88** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1516P, variante de corte y empalme 2.
- SEC ID Nº: 89** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1516P, variante de corte y empalme 3.
- SEC ID Nº: 90** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1678P:
- SEC ID Nº: 91** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1678P.
- SEC ID Nº: 92** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1678P.
- 15 **SEC ID Nº: 93** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1678P.
- SEC ID Nº: 94** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1680P.
- SEC ID Nº: 95** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1686P.
- SEC ID Nº: 96** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1687P.
- SEC ID Nº: 97** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1706P.
- 20 **SEC ID Nº: 98** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1712P.
- SEC ID Nº: 99** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1729P.
- SEC ID Nº: 100** es una secuencia de ADN de longitud completa de Ly1729P.
- SEC ID Nº: 101** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1729P.
- SEC ID Nº: 102** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1848P.
- 25 **SEC ID Nº: 103** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1859P.
- SEC ID Nº: 104** es una secuencia de proteína parcial de Ly1859P.
- SEQ ID Nº:105** es una secuencia de ADNc parcial de Ly1859P.
- SEC ID Nº: 106** es una secuencia de ADNc de longitud completa de Ly1859P.
- SEC ID Nº: 107** es una secuencia de proteína de longitud completa de Ly1859P.
- 30 **SEC ID Nº: 108** es una secuencia de ADNc de longitud completa para Ly1866P
- SEC ID Nº: 109** es una secuencia de proteína de longitud completa para Ly1866P
- SEC ID Nº: 110** es una secuencia de ADNc parcial para Ly1867P.
- SEC ID Nº: 111** es una secuencia de ADNc parcial para Ly1868P.
- SEC ID Nº: 112** es una secuencia de ADNc parcial para Ly1886P.
- 35 **SEC ID Nº: 113** es una secuencia de ADNc de longitud completa para Ly669S.
- SEC ID Nº: 114** es una secuencia de proteína de longitud completa para Ly669S.
- SEC ID Nº: 115** es una secuencia de ADNc parcial para Ly672S.

**SEC ID Nº: 116** es una secuencia de ADNc de longitud completa para Ly672S.

**SEC ID Nº: 117** es una secuencia de ADNc de longitud completa para Ly672S.

**SEC ID Nº: 118** es una secuencia de ADNc parcial de Ly675S.

**SEC ID Nº: 119** es una secuencia de proteína parcial de Ly675S.

5 **SEC ID Nº: 120** es una secuencia de proteína parcial de Ly1484P.

**SEC ID Nº: 121** es una secuencia de proteína parcial de Ly1484P.

**SEC ID Nº: 122** es una secuencia de cebador de PCR para His-Ly1452P.

**SEC ID Nº: 123** es una secuencia de cebador de PCR para His-Ly1452P.

**SEC ID Nº: 124** es una secuencia de fase abierta de lectura para Ly1451P.

10 **4. Descripción de realizaciones ilustrativas**

Para que la invención descrita en el presente documento pueda entenderse más completamente, se expone la siguiente descripción de diversas realizaciones ilustrativas.

La presente invención se refiere en general a composiciones y procedimientos para la inmunoterapia y diagnóstico de neoplasias hematológicas, tales como linfomas y leucemias de linfocitos B y mielomas múltiples.

15 **4.1 Procedimientos de suministro de ácido nucleico y transfección de ADN**

En ciertas realizaciones, se contempla que una o más composiciones de polinucleótidos sustituidos y/o ARN o ADN desveladas en el presente documento se usarán para transfectar una célula huésped apropiada. La tecnología para introducción de ARN y ADN y vectores que los comprenden en células huésped adecuadas se conoce bien por los expertos en la materia. En particular, tales polinucleótidos pueden usarse para transformar genéticamente una o más células huésped, cuando la administración terapéutica de uno o más péptidos, compuestos o vacunas activos se consigue a través de la expresión de una o más construcciones polinucleotídicas que codifican uno o más compuestos terapéuticos de interés.

Se conoce una diversidad de medios para introducir polinucleótidos y/o polipéptidos en células diana adecuadas por los expertos en la materia. Por ejemplo, cuando se contemplan polinucleótidos para suministro a células, varios procedimientos no virales para la transferencia de construcciones de expresión en células de mamífero cultivadas están disponibles para el experto en la materia para su uso. Estos incluyen, por ejemplo, precipitación de fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); precipitación de DEAE-dextrano (Gopal, 1985); electroporación (Wong y Neumann, 1982; Fromm y col., 1985; Tur-Kaspa y col., 1986; Potter y col., 1984; Suzuki y col., 1998; Vanbever y col., 1998), microinyección directa (Capecchi, 1980; Harland y Weintraub, 1985), liposomas cargados con ADN (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Takakura, 1998) y complejos de lipofectamina-ADN, sonicación celular (Fechheimer y col., 1987), bombardeo génico usando microproyectiles de alta velocidad (Yang y col., 1990; Klein y col., 1992) y transfección mediada por receptores (Curiel y col., 1991; Wagner y col., 1992; Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988). Algunas de estas técnicas pueden adaptarse con éxito para su uso *in vivo* o *ex vivo*.

Una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula animal transformada con uno o más de los vectores de expresión desvelados representan un aspecto importante de la presente invención. Tales células huésped transformadas son con frecuencia deseables para su uso en la expresión de diversas construcciones génicas de ADN desveladas en el presente documento. En algunos aspectos de la invención es con frecuencia deseable modular, regular o controlar de otro modo la expresión de los segmentos génicos desvelados en el presente documento. Tales procedimientos son rutinarios para los expertos en la técnica de la genética molecular. Típicamente cuando se desea sobreexpresión o aumento de la expresión de un gen particular, pueden emplearse diversas manipulaciones para potenciar la expresión del ARN mensajero, particularmente usando un promotor activo y, en particular, un promotor específico de tejido tal como los desvelados en el presente documento, así como empleando secuencias que potencian la estabilidad del ARN mensajero en la célula huésped transformada particular.

Típicamente, la región de inicio y terminación de la traducción implicará codón o codones de parada, una región terminadora y, opcionalmente, una señal de poliadenilación. En la dirección de la transcripción, es decir en la dirección 5' a 3' de la secuencia codificante o sentido, la construcción incluirá la región reguladora transcripcional, si la hubiera, y el promotor, pudiendo estar la región reguladora 5' o 3' del promotor, el sitio de unión ribosómico, el codón de inicio, teniendo el gen estructural una fase abierta de lectura en fase con el codón de inicio, el codón o codones de parada, la secuencia de señal de poliadenilación, si la hubiera, y la región terminadora. Esta secuencia como una doble cadena puede usarse por sí misma para la transformación de un microorganismo o huésped eucariota, pero habitualmente se incluirá con una secuencia de ADN que implica un marcador, pudiendo unirse la

segunda secuencia de ADN a la construcción de expresión durante la introducción del ADN al huésped.

Cuando no está presente sistema de replicación funcional, la construcción también incluirá preferentemente una secuencia de al menos aproximadamente 30, aproximadamente 40 o aproximadamente 50 pares de bases (pb), preferentemente al menos aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80 o aproximadamente 90 a aproximadamente 100 pb y habitualmente no más de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 pb de una secuencia homóloga con una secuencia en el huésped. De esta manera, la probabilidad de recomendación legítima se potencia, de modo que el gen se integrará en el huésped y se mantendrá de forma estable por el huésped. Convenientemente, las regiones reguladoras de la construcción de expresión estarán en proximidad cercana con (y también posicionadas operativamente en relación con) el gen terapéutico seleccionado que proporciona complementación así como el gen que proporciona la ventaja competitiva. Por lo tanto, en caso de que el gen terapéutico se pierda, el organismo resultante probablemente también perderá el gen que proporciona la ventaja competitiva, de modo que será incapaz de competir en el ambiente con el gen que conserva la construcción intacta.

El gen terapéutico seleccionado puede introducirse entre la región de inicio de la transcripción y traducción y la región de terminación de la transcripción y traducción, de modo que esté bajo el control regulador de la región de inicio. Esta construcción puede incluirse en un plásmido, que incluirá al menos un sistema de replicación, pero puede incluir más de uno, cuando se emplea un sistema de replicación para clonar durante el desarrollo del plásmido y el segundo sistema de replicación es necesario para la actuación en el huésped final, en este caso, una célula huésped de mamífero. Además, pueden estar presentes uno o más marcadores, que se han descrito previamente. Cuando se desea integración, el plásmido incluirá convenientemente una secuencia homóloga con el genoma del huésped.

Pueden insertarse genes u otros segmentos de ácido nucleico, como se desvela en el presente documento, en células huésped usando una diversidad de técnicas que se conocen bien en la materia. Se han descrito cinco procedimientos generales para suministrar un segmento nucleico a células: (1) procedimientos químicos (Graham y Van Der Eb, 1973); (2) procedimientos físicos tales como microinyección (Capecchi, 1980), electroporación (Patente de Estados Unidos 5.472.869; Wong y Neumann, 1982; Fromm y col., 1985), bombardeo de microproyectiles (Patente de Estados Unidos 5.874.265, incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad), "pistola génica" (Yang y col., 1990); (3) vectores virales (Eglitis y Anderson, 1988); (4) mecanismos mediados por receptor (Curiel y col., 1991; Wagner y col., 1992); y (5) transformación mediada por bacterias.

#### **4.2 Anticuerpos específicos relacionados con neoplasias hematológicas y fragmentos de unión a antígenos de los mismos**

La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a (o son inmunoespecíficos para) al menos un primer péptido o variante peptídica como se desvela en el presente documento. Como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno "se une específicamente" a un péptido si reacciona a un nivel detectable (dentro de, por ejemplo, un ELISA) con el péptido y no reacciona de forma detectable con péptidos o proteínas no relacionados en condiciones similares. Como se usa en el presente documento, "unión" se refiere a una asociación no covalente entre dos moléculas separadas de modo que se forme un "complejo". La capacidad para unirse puede evaluarse, por ejemplo, determinando una constante de unión para la formación del complejo. La constante de unión es el valor obtenido cuando la concentración del complejo se divide por el producto de las concentraciones de los componentes. En el contexto de la presente invención, en general, se dice que dos compuestos se "unen" cuando la constante de unión para la formación de complejo excede aproximadamente  $10^3$  l/mol. La constante de unión puede determinarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Cualquier agente que satisfaga los requisitos anteriores puede ser un agente de unión. En realizaciones ilustrativas, un agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Tales anticuerpos pueden prepararse por cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas para los expertos en la materia (Harlow y Lane, 1988). En general, pueden producirse anticuerpos por técnicas de cultivo celular, incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales como se describe en el presente documento o mediante transfección de genes de anticuerpo en huéspedes celulares de mamífero o bacterianos adecuados, para permitir la producción de anticuerpos recombinantes. En una técnica, un inmunógeno que comprende el péptido se inyecta inicialmente en cualquiera de una amplia diversidad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas o cabras). En esta etapa, los péptidos de la presente invención pueden actuar como el inmunógeno sin modificación. Como alternativa, particularmente para péptidos relativamente cortos, puede inducirse una respuesta inmune superior si el péptido está unido a una proteína vehículo, tal como albúmina de suero bovino o hemocianina de lapa californiana. El inmunógeno se inyecta en el huésped animal, preferentemente de acuerdo con un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo y se extrae sangre de los animales periódicamente. Los anticuerpos policlonales específicos para el péptido pueden después purificarse de tales antisueros por, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando el péptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

"Anticuerpo" se refiere a un polipéptido codificado por un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de

región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los múltiples genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

- 5 Una unidad estructural de inmunoglobulina ejemplar (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos, es decir, un dominio de reconocimiento de antígenos. Como se usa en el presente documento, "dominio de reconocimiento de antígeno" significa la parte del anticuerpo, molécula recombinante, la proteína de fusión o el inmunoconjugado de la invención que reconoce la diana o partes de la misma. Típicamente el dominio de reconocimiento de antígenos comprende la región variable del anticuerpo o una parte del mismo, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones hipervariables. Los términos "V<sub>H</sub>" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo un Fv, scFv, dsFv o Fab. Los términos "V<sub>L</sub>" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo un Fv, scFv, dsFv o Fab.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los engarces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)'<sub>2</sub>, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab)'<sub>2</sub> puede reducirse en condiciones suaves para romper el engarce disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero F(ab)'<sub>2</sub> en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3ª ed. 1993). Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos.

Como se usa en el presente documento, "fragmento" se define como al menos una parte de la región variable de la molécula de inmunoglobulina, que se une a su diana, es decir el dominio de reconocimiento de antígeno o la región de unión a antígeno. Puede incluirse algo de la región constante de la inmunoglobulina. Los ejemplos de fragmentos funcionales de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, moléculas de anticuerpo completas, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR), V<sub>L</sub> (región variable de cadena ligera), V<sub>H</sub> (región variable de cadena pesada), Fab, F(ab)'<sub>2</sub> y cualquier combinación de los mismos o cualquier otra parte de un péptido de inmunoglobulina capaz de unirse a antígeno diana (véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* (Paul ed., 4ª. 1999). Como se aprecia por un experto en la materia, pueden obtenerse diversos fragmentos de anticuerpo por una diversidad de procedimientos, por ejemplo, digestión de un anticuerpo intacto con una enzima, tal como pepsina; o síntesis *de novo*. Los fragmentos de anticuerpos se sintetizan con frecuencia *de novo* químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo como se usa en el presente documento, incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o los identificados usando bibliotecas de presentación de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty y col., (1990) *Nature* 348: 552). El término anticuerpo también incluye moléculas bivalentes o biespecíficas, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos. Se describen moléculas bivalentes y biespecíficas en, por ejemplo, Kostelny y col., *J. Immunol.* 148: 1547 (1992), Pack y Pluckthun, *Biochemistry* 31: 1579 (1992), Zhu y col. *Protein Sci.* 6: 781 (1997), Hu y col. *Cancer Res.* 56: 3055 (1996), Adams y col., *Cancer Res.* 53: 4026 (1993), y McCartney, y col., *Protein Eng.* 8: 301 (1995).

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que los bucles de unión a antígeno, es decir, regiones determinantes de complementariedad (CDR), comprendidos por las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se injertan en una secuencia flanqueante humana. Típicamente, los anticuerpos humanizados tienen la misma especificidad de unión que los anticuerpos no humanizados descritos en el presente documento. Se conocen bien en la materia técnicas para humanizar anticuerpos y se describen en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.567; 5.530.101; 5.859.205; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.777.085; 6.180.370; 6.210.671; y 6.329.511; documento WO 87/02671; Solicitud de Patente EP 0173494; Jones y col., *Nature* 321: 522 (1986); y Verhoyen y col., *Science* 239: 1534 (1988). Se describen adicionalmente anticuerpos humanizados en, por ejemplo, Winter y Milstein, *Nature* 349: 293 (1991).

Para preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, puede usarse cualquier técnica conocida en la materia (véase, por ejemplo, Kohler & Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor y col., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole y col., pág. 77-96 en *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc. (1985)).

Se conocen por los expertos en la materia procedimientos para producir anticuerpos policlonales. En un procedimiento ejemplar, se inmuniza una cepa endogámica de ratones (por ejemplo, ratones BALB/C) o conejos con el quelado o un análogo estructural cercano usando un adyuvante convencional, tal como adyuvante de Freund y un protocolo de inmunización convencional. Como alternativa, o además del uso de un adyuvante, el quelado se acopla a un vehículo que es en sí mismo inmunogénico (por ejemplo, hemocianina de lapa californiana ("KLH")). La respuesta inmune del animal a la preparación de inmunógeno se controla tomando muestras de sangre de ensayo y



determinando la titulación de reactividad para las subunidades beta. Cuando se obtienen titulaciones apropiadamente altas de anticuerpo para el inmunógeno, se recoge sangre del animal y se preparan antisueros. Puede realizarse fraccionamiento adicional de los antisueros para enriquecer con respecto a anticuerpos reactivos a la proteína si se desea.

5 Se obtienen anticuerpos monoclonales por diversas técnicas familiares para los expertos en la materia. Brevemente, se immortalizan células de bazo de un animal inmunizado con un antígeno deseado, habitualmente por fusión con una célula de mieloma (véase, por ejemplo, Kohler & Milstein, Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976)). Los procedimientos alternativos de immortalización incluyen transformación con Virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus u otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Se exploran colonias que surgen de células  
10 inmortalizadas sencillas con respecto a la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas para el antígeno y puede potenciarse la producción de los anticuerpos monoclonales producidos por tales células por diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado. Como alternativa, pueden aislarse secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo explorando una biblioteca de ADN de linfocitos B humanos de acuerdo con el protocolo general descrito por Huse y col., Science 246: 1275-1281 (1989).  
15

Se recogen anticuerpos monoclonales y sueros policlonales y se titulan frente al inmunógeno en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo de fase sólida con el inmunógeno inmovilizado en un soporte sólido. Típicamente, se seleccionan antisueros policlonales con una titulación de  $10^4$  o más y se ensayan con respecto a reactividad cruzada frente a diferentes quelados, usando un inmunoensayo de unión competitiva. Los antisueros policlonales y  
20 anticuerpos monoclonales específicos se unirán habitualmente con una  $K_d$  de al menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente al menos aproximadamente 1  $\mu$ M, preferentemente, al menos aproximadamente 0,1  $\mu$ M o mejor y, más preferentemente, 0,01  $\mu$ M o mejor.

Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos para quelados reactivos y otros agentes de diagnóstico, analíticos y terapéuticos. Además, pueden usarse ratones transgénicos u otros organismos tales como otros mamíferos para  
25 expresar anticuerpos humanizados. Como alternativa, puede usarse tecnología de presentación de fagos para producir e identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty y col., Nature 348: 552-554 (1990); Marks y col., Biotechnology 10: 779-783 (1992)).

30 En una realización ejemplar, un animal, tal como un conejo o ratón se inmuniza con un quelado o una construcción inmunogénica. Los anticuerpos producidos como resultado de la inmunización se aíslan preferentemente usando procedimientos convencionales.

En una realización preferida adicional, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. "Humanizado" se refiere a una secuencia polipeptídica no humana que se ha modificado para minimizar la inmunorreactividad en seres humanos, típicamente alterando la secuencia de aminoácidos para imitar secuencias humanas existentes, sin alterar  
35 sustancialmente la función de la secuencia polipeptídica (véase, por ejemplo, Jones y col., Nature 321: 522-525 (1986), y solicitud de patente de Reino Unido publicada N° 8707252).

En otra realización preferida, la presente invención proporciona un anticuerpo, como se ha descrito anteriormente, que comprende adicionalmente un miembro seleccionado de marcadores detectables, agentes biológicamente  
40 activos y combinaciones de los mismos unidos a anticuerpo.

Cuando el anticuerpo se conjuga con un marcador detectable, el marcador es preferentemente un miembro seleccionado del grupo que consiste en isótopos radioactivos, agentes fluorescentes, precursores de agentes fluorescentes, cromóforos, enzimas y combinaciones de los mismos. Se conocen bien en la técnica procedimientos para conjugar diversos grupos con anticuerpos. Por ejemplo, un marcador detectable que se conjuga  
45 frecuentemente con un anticuerpo es una enzima, tal como peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa y glucosa oxidasa.

Se conocen bien en la técnica procedimientos para producir anticuerpos marcados con moléculas pequeñas, por ejemplo, agentes fluorescentes. Los anticuerpos marcados con fluorescencia pueden usarse en tinción inmunohistoquímica (Osborn y col., Methods Cell Biol. 24: 97-132 (1990); en citometría de flujo o técnicas de  
50 separación de células (Ormerod, M. G. (ed.), FLOW CYTOMETRY. A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Nueva York, 1990); para rastreo y localización de antígenos y en diversos procedimientos de doble tinción (Kawamura, A., Jr., FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUES AND THEIR APPLICATION, Univ. Tokyo Press, Baltimore, 1977).

Muchos marcadores fluorescentes reactivos están disponibles en el mercado (por ejemplo, Molecular Probes, Eugene, OR) o pueden sintetizarse usando técnicas reconocidas en la materia. En una realización ejemplar, un anticuerpo de la invención se marca con un agente fluorescente reactivo a amina, tal como isotiocianato de fluoresceína en condiciones suavemente básicas. Para otros ejemplos de técnicas de marcaje de anticuerpos,  
55 véase, Goding, J. Immunol. Methods 13: 215-226 (1976); y en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE, págs. 6-58, Academic Press, Orlando (1988).

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales específicos para el péptido antigénico de interés, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein (1976) y mejoras de la misma. Brevemente, estos procedimientos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el péptido de interés). Tales líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, de células de bazo obtenidas de un animal inmunizado como se ha descrito anteriormente. Las células de bazo se immortalizan después por, por ejemplo, fusión con un compañero de fusión de célula de mieloma, preferentemente uno que es singénico con el animal inmunizado. Puede emplearse una diversidad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células de bazo y células de mieloma pueden combinarse con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y después sembrarse en placas a baja densidad en un medio selectivo que soporte el crecimiento de células híbridas, pero no células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, habitualmente aproximadamente de 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias sencillas y sus sobrenadantes de cultivo se ensayan con respecto a actividad de unión frente al péptido. Se prefieren hibridomas que tengan alta reactividad y especificidad.

Pueden aislarse anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de colonias de hibridoma crecientes. Además, pueden emplearse diversas técnicas para potenciar el rendimiento, tal como inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales pueden después recogerse del fluido ascítico o de la sangre. Pueden retirarse contaminantes de los anticuerpos por técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Los péptidos de la presente invención pueden usarse en el procedimiento de purificación en, por ejemplo, una etapa de cromatografía de afinidad.

Dentro de ciertas realizaciones, puede preferirse el uso de fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fab, que pueden prepararse usando técnicas convencionales. Brevemente, pueden purificarse inmunoglobulinas de suero de conejo por cromatografía de afinidad en columnas de perlas de proteína A (Harlow y Lane, 1988) y digerirse por papaína para producir fragmentos Fab y Fc. Los fragmentos Fab y Fc pueden separarse por cromatografía de afinidad en columnas de perlas de Proteína A.

Pueden acoplarse anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos con uno o más agentes terapéuticos. Los agentes adecuados a este respecto incluyen indicadores radiactivos y agentes quimioterapéuticos, que pueden usarse, por ejemplo, para purgar médula ósea autóloga *in vitro*). Los agentes terapéuticos representativos incluyen radionúclidos, inductores de diferenciación, fármacos, toxinas y derivados de los mismos. Los radionúclidos preferidos incluyen  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$  y  $^{212}\text{Bi}$ . Los fármacos preferidos incluyen metotrexato y análogos de pirimidina y purina. Los inductores de diferenciación preferidos incluyen ésteres de forbol y ácido butírico. Las toxinas preferidas incluyen ricina, abrina, toxina de difteria, toxina del cólera, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de *Shigella* y proteína antiviral de *Phytolacca americana*. Para fines de diagnóstico, puede usarse acoplamiento de agentes radiactivos para facilitar el seguimiento de metástasis o para determinar la localización de tumores positivos relacionados con neoplasias hematológicas.

Un agente terapéutico puede acoplarse (por ejemplo, enlazarse covalentemente) con un anticuerpo monoclonal adecuado directamente o indirectamente (por ejemplo, mediante un grupo de engarce). Una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Como alternativa, puede ser deseable acoplar un agente terapéutico y un anticuerpo mediante un grupo de engarce. Un grupo de engarce puede actuar como un espaciador para distanciar un anticuerpo de un agente para evitar interferencia con las capacidades de unión. Un grupo de engarce también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente o un anticuerpo y de este modo aumentar la eficacia de acoplamiento. Un aumento de la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes o grupos funcionales en agentes que de otro modo no sería posible.

Resultará evidente para los expertos en la materia que puede emplearse una diversidad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo como heterofuncionales (tales como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, IL), como el grupo de engarce. El acoplamiento puede efectuarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo y grupos sulfhidrilo o restos de carbohidrato oxidado. Existen numerosas referencias que describen dicha metodología, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.671.958.

Cuando un agente terapéutico es más potente cuando está sin la parte de anticuerpo de los inmunoconjugados de la presente invención, puede ser deseable usar un grupo de engarce que puede escindirse durante o tras la internalización en una célula. Se han descritos varios grupos de engarce escindibles diferentes. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente de estos grupos de engarce incluyen escisión por reducción de un enlace disulfuro (Patente de Estados Unidos N° 4.489.710), por irradiación de un enlace fotolábil (Patente de Estados Unidos N° 4.625.014), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivatizadas (Patente de Estados Unidos N° 4.638.045), por hidrólisis mediada por complemento (Patente de Estados Unidos N° 4.671.958) e hidrólisis catalizada por ácido (Patente de Estados Unidos N° 4.569.789).

Puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo. En una realización, se acoplan múltiples moléculas de un agente a una molécula de anticuerpo. En otra realización, puede acoplarse más de un tipo de agente a un anticuerpo. Independientemente de la realización particular, pueden prepararse inmunoconjugados con más de un agente de una diversidad de maneras. Por ejemplo, puede acoplarse más de un agente directamente a una molécula de anticuerpo o pueden usarse engarces que proporcionan múltiples sitios de unión. Como alternativa, puede usarse un vehículo. Un vehículo puede portar los agentes de una diversidad de maneras, incluyendo enlace covalente directamente o mediante un grupo de engarce. Los vehículos adecuados incluyen proteínas tales como albúminas (Patente de Estados Unidos N° 4.507.234), péptidos y polisacáridos tales como aminodextrano (Patente de Estados Unidos N° 4.699.784). Un vehículo también puede portar un agente por enlace no covalente o por encapsulación, tal como dentro de una vesícula de liposoma (Patente de Estados Unidos N° 4.429.008 y Patente de Estados Unidos N° 4.873.088). Los vehículos específicos para agentes radionúclidos incluyen moléculas pequeñas radiohalogenadas y compuestos quelantes. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.735.792 desvela moléculas pequeñas radiohalogenadas representativas y su síntesis. Un quelado radionúclido puede formarse a partir de compuestos quelantes que incluyen los que contienen nitrógeno y átomos de azufre como los átomos donadores para unir el radionúclido metálico o de óxido metálico. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.673.562 desvela compuestos quelantes representativos y su síntesis.

Puede usarse una diversidad de rutas de administración para los anticuerpos e inmunoconjugados. Típicamente, la administración será intravenosa, intramuscular, subcutánea o en el lecho de un tumor resecaado. Resultará evidente que la dosis precisa del anticuerpo/inmunoconjugado variará dependiendo del anticuerpo usado, la densidad de antígeno en el tumor y la tasa de eliminación del anticuerpo.

También se proporcionan en el presente documento anticuerpos antiidiotípicos que imitan una parte inmunogénica de péptido relacionado con tumor maligno hematológico. Tales anticuerpos pueden inducirse contra un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una parte inmunogénica de péptido relacionado con tumor maligno hematológico, usando técnicas bien conocidas. Son anticuerpos antiidiotípicos que imitan una parte inmunogénica de péptido relacionado con tumor maligno hematológico los anticuerpos que se unen a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a una parte inmunogénica de péptido relacionado con tumor maligno hematológico, como se describe en el presente documento.

Independiente de la fuente del anticuerpo específico de péptido relacionado con tumor maligno hematológico original, el anticuerpo intacto, multímeros de anticuerpo o una cualquiera de una diversidad de regiones de unión a antígeno funcionales del anticuerpo pueden usarse en la presente invención. Las regiones funcionales ejemplares incluyen fragmentos scFv, Fv, Fab', Fab y F(ab')<sub>2</sub> de los anticuerpos específicos de péptido relacionado con tumor maligno hematológico. Las técnicas para preparar tales construcciones se conocen bien por los expertos en la materia y se ejemplifican adicionalmente en el presente documento.

La selección de construcción de anticuerpo puede verse influenciada por diversos factores. Por ejemplo, puede resultar semivida prolongada de la readsorción activa de anticuerpos intactos dentro del riñón, una propiedad de la parte Fc de inmunoglobulina. Se espera, por lo tanto, que los anticuerpos basados en IgG muestren eliminación en sangre más lenta que sus homólogos de Fab'. Sin embargo, las composiciones basada en fragmento de Fab' generalmente mostrarán mejor capacidad de penetración de tejido.

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo por proteólisis de la inmunoglobulina completa por la proteasa de tiol no específica, papaína. La digestión con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados "fragmentos Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno sencillo y un "fragmento Fc" residual.

La papaína debería activarse primero reduciendo el grupo sulfhidrilo en el sitio activo con cisteína, 2-mercaptoetanol o ditioneitol. Los metales pesados en la enzima de reserva deberían retirarse por quelación con EDTA (2 mM) para asegurar la actividad enzimática máxima. Se mezclan normalmente enzima y sustrato juntos en la relación de 1:100 en peso. Después de la incubación, la reacción puede detenerse por alquilación irreversible del grupo tiol con yodoacetamida o simplemente por diálisis. La compleción de la digestión debería controlarse por SDS-PAGE y las diversas fracciones separarse por proteína A-Sepharose o cromatografía de intercambio iónico.

El procedimiento habitual para preparación de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de IgG de origen humano y de conejo es proteólisis limitada por la enzima pepsina. Las condiciones, exceso de anticuerpo 100x p/p en tampón de acetato a pH 4,5, 37 °C, sugieren que el anticuerpo se escinde en el extremo C terminal del enlace disulfuro entre cadenas pesadas. Las tasas de digestión de IgG de ratón pueden variar con la subclase y puede ser difícil obtener altos rendimientos de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> activos sin algo de IgG no digerida o completamente degradada. En particular, IgG<sub>2b</sub> es altamente susceptible a la degradación completa. Las otras subclases requieren diferentes condiciones de incubación para producir resultados óptimos, todas las cuales se conocen en la técnica.

El tratamiento con pepsina de anticuerpos intactos produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación de antígenos y aún es capaz de entrecruzar antígenos. La digestión de IgG de rata por pepsina requiere condiciones que incluyen diálisis en tampón de acetato 0,1 M, pH 4,5 y después incubación durante 4 horas con pepsina 1 % p/p; la digestión de IgG e IgG<sub>2a</sub> se mejora si primero se dializan frente a tampón de formato 0,1 M, pH 2,8, a 4 °C, durante 16 horas seguido de tampón de acetato. IgG<sub>2b</sub> proporciona resultados más consistentes con incubación en

proteasa V8 de estafilococos (3 % p/p) en tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,8, durante 4 horas a 37 °C.

Un fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH2 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Se produjeron originalmente fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El término "variable", como se usa en el presente documento en referencia a anticuerpos, significa que ciertas partes de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular con su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de forma homogénea a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentran en tres segmentos denominados "regiones hipervariables", en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada.

Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denomina la región flanqueante (FR). Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), adoptando en gran medida una configuración de lámina β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β.

Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (Kabat y col., 1991, incorporada específicamente en el presente documento por referencia). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La expresión "región hipervariable" como se usa en el presente documento, se refiere a los restos aminoacídicos de un anticuerpo que son responsables de unión a antígeno. La región hipervariable comprende restos aminoacídicos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-56 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada (Kabat y col., 1991, incorporada específicamente en el presente documento por referencia) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir, restos 26-32 (L1), 50-52(L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada). Restos "flanqueantes" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se define en el presente documento.

Un fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígenos completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración en la que tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. De forma colectiva, seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de anticuerpo, estando presentes estos dominios en una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un engarce polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite al sFv formar la estructura deseada para unión a antígeno.

Los "diacuerpos" son fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena polipeptídica (V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>). Usando un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen en la Solicitud de Patente Europea Nº EP 404.097 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 93/11161, incorporada específicamente cada una en el presente documento por referencia. Los "anticuerpos lineales", que pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, comprenden un par de segmentos Fv en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>) que forman un par de regiones de unión a antígeno, como se describe en Zapata y col. (1995), incorporada específicamente en el presente documento por referencia.

Otros tipos de variantes son anticuerpos con propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generan. Tales variantes, o compuestos de segunda generación, son típicamente variantes de sustitución que incluyen uno o más restos de región hipervariable sustituidos de un anticuerpo parental. Un modo conveniente para generar tales variantes de sustitución es la maduración de afinidad usando presentación de fagos.

En la maduración de afinidad usando presentación de fagos, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, de 6 a 7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones amino posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo

generadas de este modo se presentan de una manera monovalente de partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto de gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes con presentación de fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se ha desvelado en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración de alanina en restos de región hipervariable identificados como significativamente contribuyentes a la unión de antígeno.

Como alternativa, o además, la estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo puede definirse y analizarse para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y la diana. Tales restos de contacto y restos cercanos son candidatos para sustitución. Una vez que se han generado tales variantes, el panel de variantes se somete a exploración y los anticuerpos con análogos pero propiedades diferentes o incluso superiores en uno o más ensayos relevantes se seleccionan para el desarrollo adicional.

Al usar un fragmento Fab' o de unión a antígeno de un anticuerpo, con los beneficios consiguientes en la penetración de tejido, pueden derivarse ventajas adicionales de la modificación de fragmento para aumentar su semivida. Pueden emplearse una diversidad de técnicas, tales como manipulación, modificación de la molécula de anticuerpo en sí misma y también conjugación con vehículos inertes. Cualquier conjugación para el único fin de aumentar la semivida, en lugar de suministrar un agente a una diana, debería enfocarse con cuidado porque Fab' y otros fragmentos se seleccionan para penetrar tejidos. No obstante, se contempla la conjugación con polímeros no proteicos, tales como PEG y similares.

Las modificaciones distintas de conjugación se basan por lo tanto en la modificación de la estructura del fragmento de anticuerpo para hacerlo más estable y/o reducir la tasa de catabolismo en el cuerpo. Un mecanismo para tales modificaciones es el uso de aminoácidos D en lugar de aminoácidos L. Los expertos en la materia entenderán que la introducción de tales modificaciones debe seguirse de ensayos rigurosos de la molécula resultante para asegurar que aún conserva las propiedades biológicas deseadas. Las modificaciones estabilizadoras adicionales incluyen el uso de la adición de restos estabilizadores en el extremo N terminal o el C terminal, o ambos, que generalmente se usa para prolongar la semivida de moléculas biológicas. Únicamente como ejemplo, puede desearse modificar los extremos terminales por acilación o aminación.

Las modificaciones de tipo conjugación moderadas para su uso con la presente invención incluyen incorporar un epítipo de unión a receptor de recuperación en el fragmento de anticuerpo. Las técnicas para conseguir esto incluyen mutación de la región apropiada del fragmento de anticuerpo o incorporar el epítipo como un marcador peptídico que se une al fragmento del anticuerpo. La Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 96/32478 se incorpora específicamente en el presente documento por referencia para los fines de ejemplificar adicionalmente dicha tecnología. Los epítopos de unión a receptor de recuperación son típicamente regiones de tres o más aminoácidos de uno o dos bucles del dominio Fc que se transfieren a la posición análoga en el fragmento de anticuerpo. Los epítopos de unión a receptor de recuperación desvelados en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 98/45331 se incorporan en el presente documento por referencia para su uso con la presente invención.

#### 4.3 Composiciones de linfocitos T específicas para péptidos relacionados con neoplasias hematológicas

Las composiciones inmunoterapéuticas pueden también, o como alternativa, comprender linfocitos T específicos para neoplasias hematológicas relacionados. Tales células pueden generalmente prepararse *in vitro* o *ex vivo*, usando procedimientos convencionales. Por ejemplo, pueden estar presentes linfocitos T dentro de (o aislados de) médula ósea, sangre periférica o una fracción de médula ósea o sangre periférica de un mamífero, tal como un paciente, usando un sistema de separación de células disponible en el mercado, tal como el Sistema Isolex™, disponible de Nexell Therapeutics, Inc. (Irvine, CA; véase también Patente de Estados Unidos N° 5.240.856; Patente de Estados Unidos N° 5.215.926; Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 89/06280; Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 91/16116 y Publicación de solicitud de Patente Internacional N° WO 92/07243). Como alternativa, pueden derivar de linfocitos T de seres humanos, mamíferos no humanos, líneas celulares o cultivos relacionados o no relacionados.

Pueden estimularse los linfocitos T con péptido relacionado con tumor maligno hematológico, polinucleótido que codifica un péptido relacionado con tumor maligno hematológico y/o una célula presentadora de antígenos (APC) que expresa un péptido relacionado con tumor maligno hematológico. Dicha estimulación se realiza en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la generación de linfocitos T que son específicos para el péptido relacionado con tumor maligno hematológico. Preferentemente, un péptido o polinucleótido relacionado con tumor maligno hematológico está presente dentro de un vehículo de suministro, tal como una microesfera, para facilitar la generación de linfocitos T específicos de antígeno. Brevemente, los linfocitos T, que pueden aislarse de un paciente o un donante relacionado o no relacionado por técnicas rutinarias (tales como por centrifugación de gradiente de densidad Ficoll/Hypaque® de linfocitos de sangre periférica), se incuban con péptido relacionado con tumor maligno hematológico. Por ejemplo, pueden incubarse linfocitos T *in vitro* durante 2-9 días (típicamente 4 días) a 37 °C con péptido relacionado con tumor maligno hematológico (por ejemplo, 5 a 25 µg/ml) o células que sintetizan una cantidad comparable de péptido relacionado con tumor maligno hematológico. Puede ser deseable incubar una alícuota separada de una muestra de linfocitos T en ausencia de péptido relacionado con tumor maligno

hematológico para actuar como un control.

Se considera que los linfocitos T son específicos para un péptido relacionado con tumor maligno hematológico si los linfocitos T matan células diana revestidas con un péptido relacionado con tumor maligno hematológico o que expresan un gen que codifica dicho péptido. Puede evaluarse la especificidad de linfocitos T usando cualquiera de una diversidad de técnicas convencionales. Por ejemplo, dentro de un ensayo de liberación de cromo o ensayo de proliferación, un índice de estimulación de aumento mayor de dos veces en lisis y/o proliferación, en comparación con controles negativos, indica especificidad de linfocitos T. Tales ensayos pueden realizarse, por ejemplo, como se describe en Chen y col. (1994). Como alternativa, la detección de la proliferación de linfocitos T puede conseguirse por una diversidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, la proliferación de linfocitos T puede detectarse midiendo una tasa aumentada de síntesis de ADN (por ejemplo, por cultivos de marcaje en pulsos de linfocitos T con timidina tritiada y midiendo la cantidad de timidina tritiada incorporada en el ADN). Otros modos para detectar proliferación de linfocitos T incluyen medir aumentos de la producción de interleucina 2 (IL-2), flujo de  $Ca^{2+}$  o captación del colorante, tal como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio. Como alternativa, puede medirse la síntesis de linfocinas (tales como interferón gamma) o puede cuantificarse el número relativo de linfocitos T que pueden responder a un péptido relacionado con tumor maligno hematológico. El contacto con un péptido relacionado con tumor maligno hematológico (200 ng/ml - 100  $\mu$ g/ml, preferentemente 100 ng/ml - 25  $\mu$ g/ml) durante 3-7 días debería dar como resultado un aumento de al menos dos veces en la proliferación de los linfocitos T y/o el contacto como se ha descrito anteriormente durante 2-3 horas debería dar como resultado la activación de los linfocitos T, según se mide usando ensayos de citocina convencionales en los que un aumento de dos veces en el nivel de liberación de citocinas (por ejemplo, TNF o IFN- $\gamma$ ) es indicativo de la activación de linfocitos T (Coligan y col., 1998). Los linfocitos T específicos relacionados con tumor maligno hematológico pueden expandirse usando técnicas convencionales. Dentro de las realizaciones preferidas, los linfocitos T se derivan de un paciente o un donante relacionado o no relacionado y se administran al paciente después de estimulación y expansión.

Los linfocitos T que se han activado en respuesta a un péptido relacionado con un tumor maligno hematológico, polinucleótido o APC que expresa en relación con tumor maligno hematológico pueden ser CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup>. La activación específica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> puede detectarse en una diversidad de maneras. Los procedimientos para detectar activación de linfocitos T específicos incluyen detección de la proliferación de linfocitos T, la producción de citocinas (por ejemplo, linfocinas) o la generación de actividad citolítica (es decir, generación de linfocitos T citotóxicos específicos para péptido relacionado con tumor maligno hematológico). Para linfocitos T CD4<sup>+</sup>, un procedimiento preferido para detectar activación de linfocitos T específicos es la detección de la proliferación de linfocitos T. Para linfocitos T CD8<sup>+</sup>, un procedimiento preferido para detectar activación de linfocitos T específicos es la detección de la generación de actividad citolítica.

Para fines terapéuticos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> que proliferan en respuesta al péptido relacionado con tumor maligno hematológico, polinucleótido o APC pueden expandirse en número *in vitro* o *in vivo*. La proliferación de tales linfocitos T *in vitro* puede conseguirse de una diversidad de maneras. Por ejemplo, los linfocitos T pueden volver a exponerse al péptido relacionado con tumor maligno hematológico, con o sin la adición de factores de crecimiento de linfocitos T, tales como interleucina-2, y/o células estimuladoras que sintetizan un péptido relacionado con tumor maligno hematológico. La adición de células estimuladoras se prefiere cuando se generan respuestas de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos T pueden dejarse crecer a grandes números *in vitro*, con retención de especificidad en respuesta a reestimulación intermitente con péptido relacionado con tumor maligno hematológico. Brevemente, para la estimulación primaria *in vitro* (IVS), pueden colocarse grandes números de linfocitos (por ejemplo, más de  $4 \times 10^7$ ) en matraces con medios que contienen suero humano. Puede añadirse péptido relacionado con tumor maligno hematológico (por ejemplo, péptido a 10  $\mu$ g/ml) directamente, junto con toxoide del tétanos (por ejemplo, 5  $\mu$ g/ml). Los matraces pueden incubarse después (por ejemplo, 37 °C durante 7 días). Para una segunda IVS, Los linfocitos T se recogen después y se colocan en nuevos matraces con  $2-3 \times 10^7$  células mononucleares de sangre periférica irradiadas. Se añade péptido relacionado con tumor maligno hematológico (por ejemplo, 10  $\mu$ g/ml) directamente. Los matraces se incuban a 37 °C durante 7 días. El día 2 y día 4 después de la segunda IVS, pueden añadirse 2-5 unidades de interleucina 2 (IL-2). Para una tercera IVS, los linfocitos T pueden colocarse en pocillos y estimularse con los linfocitos B transformados con EBV del propio individuo revestidos con el péptido. Puede añadirse IL-2 los días 2 y 4 de cada ciclo. En cuanto se muestra que las células son linfocitos T citotóxicos específicos, pueden expandirse usando un ciclo de estimulación de 10 días con IL-2 mayor (20 unidades) los días 2, 4 y 6.

Como alternativa, uno o más linfocitos T que proliferan en presencia de péptido relacionado con tumor maligno hematológico pueden expandirse en número por clonación. Los procedimientos para clonar células se conocen bien en la técnica e incluyen dilución limitante. Pueden purificarse linfocitos T de respuesta de la sangre periférica de pacientes sensibilizados por centrifugación de gradiente de densidad y formación de rosetas de glóbulos rojos de oveja y establecerse en cultivo por estimulación con el antígeno nominal en presencia de células de carga autólogas irradiadas. Para generar líneas de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se usa péptido relacionado con tumor maligno hematológico como el estímulo antigénico y se usan linfocitos de sangre periférica autólogos (PBL) o líneas celulares linfoblastoides (LCL) inmortalizadas por infección con virus de Epstein Barr como células presentadoras de antígenos. Para generar líneas de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, pueden usarse células presentadoras de antígenos autólogas transfectadas con un vector de expresión que produce péptido relacionado con tumor maligno hematológico como células estimuladoras. Las líneas de linfocitos T establecidas pueden clonarse 2-4 días después de la estimulación

con antígeno sembrando en placas los linfocitos T estimulados a una frecuencia de 0,5 células por pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos con  $1 \times 10^6$  células PBL o LCL irradiadas e interleucina 2 recombinante (rIL2) (50 U/ml). Los pocillos con crecimiento clonal establecido pueden identificarse a aproximadamente 2-3 semanas después de la siembra inicial y volver a estimularse con antígeno apropiado en presencia de células presentadoras de antígenos autólogas, expandirse después posteriormente mediante la adición de dosis bajas de rIL2 (10 U/ml) 2-3 días después de la estimulación con antígenos. Los clones de linfocitos T pueden mantenerse en placas de 24 pocillos por reestimulación periódica con antígeno y rIL2 aproximadamente cada dos semanas. Las células clonadas y/o expandidas pueden administrarse de nuevo al paciente como se describe, por ejemplo, en Chang y col., (1996).

Dentro de ciertas realizaciones, los linfocitos T alogénicos pueden sensibilizarse (es decir, sensibilizarse a neoplasias hematológicas relacionados) *in vivo* y/o *in vitro*. Dicha sensibilización puede conseguirse poniendo en contacto linfocitos T con un péptido relacionado con tumor maligno hematológico, un polinucleótido que codifica dicho péptido o una célula que produce dicho péptido en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la sensibilización de linfocitos T. En general, se considera que los linfocitos T están sensibilizados y, por ejemplo, el contacto con un péptido relacionado con tumor maligno hematológico da como resultado proliferación y/o activación de los linfocitos T, según se mide por ensayos de proliferación, de liberación de cromo y/o de liberación de citocinas convencionales como se describe en el presente documento. Un índice de estimulación de un aumento de más de dos veces en la proliferación o lisis y aumento de más de tres veces en el nivel de citocinas, en comparación con controles negativos indica especificidad de linfocitos T. Pueden emplearse células sensibilizadas *in vitro*, por ejemplo, dentro del trasplante de médula ósea o como infusión de linfocitos donadores.

Los linfocitos T específicos para péptido relacionado con tumor maligno hematológico pueden matar células que expresan proteína relacionada con tumor maligno hematológico. La introducción de genes que codifican cadenas receptoras de linfocitos T (TCR) para péptido relacionado con tumor maligno hematológico se usan como un medio para mejorar cuantitativa y cualitativamente respuestas a células de leucemia y cáncer que portan péptido relacionado con tumor maligno hematológico. Las vacunas para aumentar el número de linfocitos T que pueden reaccionar con células positivas para péptido relacionado con tumor maligno hematológico son un procedimiento para dirigirse a células que portan péptido relacionado con tumor maligno hematológico. La terapia de linfocitos T con linfocitos T específicos para péptido relacionado con tumor maligno hematológico es otro procedimiento. Un procedimiento alternativo es introducir las cadenas de TCR específicas para péptido relacionado con tumor maligno hematológico en linfocitos T u otras células con potencial lítico. En una realización adecuada, se clonan las cadenas alfa y beta de TCR a partir de una línea de linfocitos T específicos de péptido relacionado con tumor maligno hematológico y se usan para terapia de linfocitos T adoptiva, tal como se describe en el documento WO 96/30516, incorporado en el presente documento por referencia.

#### 4.4 Composiciones farmacéuticas y formulaciones de vacuna

Dentro de ciertos aspectos, pueden incorporarse péptidos, polinucleótidos, anticuerpos y/o linfocitos T en composiciones farmacéuticas o composiciones inmunogénicas (es decir, vacunas). Como alternativa, una composición farmacéutica puede comprender una célula presentadora de antígenos (por ejemplo, una célula dendrítica) transfectada con un polinucleótido relacionado con tumor maligno hematológico de modo que la célula presentadora de antígenos expresa un péptido relacionado con tumor maligno hematológico. Las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más de tales compuestos o células y un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. Las vacunas pueden comprender uno o más de tales compuestos o células y un inmunoadyuvante, tal como un adyuvante o un liposoma (en el que se incorpora el compuesto). Un inmunoadyuvante puede ser cualquier sustancia que potencie o aumente una respuesta inmune (mediada por anticuerpos y/o células) a un antígeno exógeno. Los ejemplos de inmunoadyuvantes incluyen adyuvantes, microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica) y liposomas (en los que se incorpora el compuesto) (Patente de Estados Unidos N° 4.235.877). La preparación de vacuna se describe de forma general en, por ejemplo, Powell y Newman (1995). Las composiciones farmacéuticas y vacunas dentro del alcance de la presente invención también pueden contener otros compuestos, que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Por ejemplo, una o más partes inmunogénicas de otros antígenos tumorales pueden estar presentes, incorporadas en un péptido de fusión o como un compuesto separado, dentro de la composición o vacuna.

Dentro de ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y vacunas se diseñan para inducir respuestas de linfocitos T específicas para un péptido relacionado con tumor maligno hematológico en un paciente, tal como un ser humano. En general, la respuesta de linfocitos T pueden favorecerse a través del uso de péptidos relativamente cortos (por ejemplo, que comprenden menos de 23 restos aminoácidos consecutivos de un péptido relacionado con tumor maligno hematológico nativo, preferentemente 4-16 restos consecutivos, más preferentemente 8-16 restos consecutivos y aún más preferentemente 8-10 restos consecutivos). Como alternativa, o además, una vacuna puede comprender un inmunoadyuvante que potencia preferentemente una respuesta de linfocitos T. En otras palabras, el inmunoadyuvante puede potenciar el nivel de una respuesta de linfocitos T a un péptido relacionado con tumor maligno hematológico por una cantidad que es proporcionalmente mayor que la cantidad por la que se potencia una respuesta de anticuerpos. Por ejemplo, cuando se compara con un adyuvante basado en aceite convencional, tal como CFA, un inmunoadyuvante que potencia preferentemente una respuesta de linfocitos T puede potenciar una respuesta de linfocitos T proliferativa al menos dos veces, una respuesta lítica al menos 10 % y/o la activación de linfocitos T en al menos dos veces en comparación con líneas celulares de control negativo para

péptido relacionado con tumor maligno hematológico, sin potenciar de forma detectable una respuesta de anticuerpos. La cantidad en la que una respuesta de linfocitos T o anticuerpos a un péptido relacionado con tumor maligno hematológico se potencia puede determinarse generalmente usando cualquier técnica representativa conocida en la materia, tal como las técnicas proporcionadas en el presente documento.

5 Una composición farmacéutica o vacuna puede contener ADN que codifica uno o más de los péptidos como se han descrito anteriormente, de modo que el péptido se genera *in situ*. Como se ha observado anteriormente, el ADN puede estar presente dentro de cualquiera de una diversidad de sistemas de suministro conocidos por los expertos en la materia, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico, sistemas de expresión bacterianos y virales y sistemas de expresión de mamíferos. Se conocen bien en la materia numerosas técnicas de suministro de genes (Rolland, 1998, y referencias citadas en dicho documento). Los sistemas de expresión de ácido nucleico apropiados contienen las secuencias de ADN, ADNc o ARN necesarias para expresión en el paciente (tal como un promotor adecuado y señal de terminación). Los sistemas de suministro bacteriano implican la administración de una bacteria (tal como Bacilo de Calmette-Guerrin) que expresa una parte inmunogénica del péptido en su superficie celular o secreta un epítipo tal. En una realización preferida, el ADN puede introducirse usando un sistema de expresión viral (por ejemplo, vaccinia u otro pox virus, retrovirus o adenovirus), que puede implicar el uso de un virus competente de replicación no patogénica (defectuoso) (Fisher-Hoch y col., 1989; Flexner y col., 1989; Flexner y col., 1990; Patente de Estados Unidos N° 4.603.112, Patente de Estados Unidos N° 4.769.330, Patente de Estados Unidos N° 5.017.487; Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 89/01973; Patente de Estados Unidos N° 4.777.127; Patente de Gran Bretaña N° GB 2.200.651; Patente Europea N° EP 0.345.242; Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 91/02805; Berkner, 1988; Rosenfeld y col., 1991; Kolls y col., 1994; Kass-Eisler y col., 1993; Guzman y col., 1993a; y Guzman y col., 1993). Se conocen bien por los expertos en la materia técnicas para incorporar ADN en tales sistemas de expresión. El ADN también puede estar “desnudo”, como se describe, por ejemplo, en Ulmer y col. (1993) y revisado por Cohen (1993). La captación de ADN desnudo puede aumentarse revistiendo con ADN perlas biodegradables, que se transportan eficazmente a las células. Resultará evidente que una vacuna puede comprender un componente tanto polinucleotídico como peptídico. Tales vacunas pueden proporcionar una respuesta inmune mejorada.

Como se ha observado anteriormente, una composición farmacéutica o vacuna puede comprender una célula presentadora de antígenos que expresa un péptido relacionado con un tumor maligno hematológico. Para fines terapéuticos, como se describe en el presente documento, la célula presentadora de antígenos es preferentemente una célula dendrítica autóloga. Tales células pueden prepararse y transfectarse usando técnicas convencionales (Reeves y col., 1996; Tuting y col., 1998; y Nair y col., 1998). La expresión de un péptido relacionado con un tumor maligno hematológico en la superficie de una célula presentadora de antígenos puede confirmarse por estimulación *in vitro* y proliferación convencional así como ensayos de liberación de cromo, como se describe en el presente documento.

35 Resultará evidente para los expertos en la materia que tengan el beneficio de las presentes enseñanzas que una vacuna puede contener sales farmacéuticamente aceptables de los polinucleótidos y péptidos proporcionados en el presente documento. Tales sales pueden prepararse a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases orgánicas (por ejemplo, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias y aminoácidos básicos) y bases inorgánicas (por ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio). La frase “farmacéutica o farmacológicamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o de otro modo desafortunada significativa cuando se administran a un animal, o un ser humano, según sea apropiado. Como se usa en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Para administración humana, las preparaciones deberían cumplir los patrones de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales según se requiere por la Oficina de Patrones Biológicos de la Administración de Alimentos y Fármacos. También pueden incorporarse principios activos complementarios a las composiciones.

Aunque puede emplearse cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la materia en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Las composiciones de la presente invención pueden formularse para cualquier modo apropiado de administración, incluyendo por ejemplo administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo preferentemente comprende agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio pueden emplearse. También pueden emplearse microesferas biodegradables (por ejemplo, polilactato poliglicolato) como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Se desvelan microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.897.268; 5.075.109; 5.928.647; 5.811.128; 5.820.883; 5.853.763; 5.814.344 y 5.942.252. Para ciertas aplicaciones tópicas, se prefiere formulación como una crema o loción, usando componentes bien conocidos.



Tales composiciones también pueden comprender tampones (por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, péptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostatos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio), solutos que hacen a la formulación isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden formularse como un liofilizado o formularse con uno o más liposomas, microesferas, nanopartículas o sistemas de suministro micronizados usando tecnología bien conocida.

Puede emplearse cualquiera de una diversidad de inmunoestimuladores, tales como adyuvantes, en la preparación de composiciones de vacuna de la presente invención. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral y un estimulador de respuestas inmunes, tal como lípido A, proteínas derivadas de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Están disponibles en el mercado adyuvantes adecuados, por ejemplo, adyuvantes basados en alumbre (por ejemplo, Alhydrogel, Rehydrigel, fosfato de aluminio, Algamulina, hidróxido de aluminio); adyuvantes basados en aceite (Adyuvante Completo y Adyuvante Incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI), Specol, RIBI, Titer-Max, Montanide ISA50 o Seppic MONTANIDE ISA 720); adyuvantes basados en copolímeros en bloque no iónicos, citocinas (por ejemplo, GM-CSF o ligando Flat3); Adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Filadelfia, PA); sales o de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A y Quil A. Citocinas, tales como GM-CSF o interleucina 2, 7 ó 12, también pueden usarse como adyuvantes.

También pueden usarse hemocianina y hemoeritrinas en la invención. El uso de hemocianina de lapa californiana (KLH) se prefiere particularmente, aunque pueden emplearse otras hemocianinas y hemoeritrinas de moluscos y artrópodos. También pueden usarse diversos adyuvantes polisacáridos. Se prefieren particularmente variedades de poliamina de polisacáridos, tales como quitina y quitosan, incluyendo quitina desacetilada.

Un grupo preferido adicional de adyuvantes es el grupo de dipéptido de muramilo (MDP, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina) de peptidoglucanos bacterianos. También se contemplan derivados de dipéptido de muramilo, tales como el treonil-MDP derivado de aminoácido y el MTPPE derivado de ácido graso.

La Patente de Estados Unidos N° 4.950.645 describe un derivado de tripéptido-disacárido lipófilo de dipéptido de muramilo que se propone para su uso en liposomas artificiales formados a partir de fosfatidil colina y fosfatidil glicerol. Se dice que es eficaz en la activación de monocitos humanos y la destrucción de células tumorales, pero no es tóxico en dosis generalmente alta. Los compuestos de la Patente de Estados Unidos N° 4.950.645 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 91/16347 también se proponen para su uso para conseguir aspectos particulares de la presente invención.

También pueden usarse BCG y esqueleto de pared celular (CWS) de BCG como adyuvantes de la invención, con o sin trehalosa dimicolato. Puede usarse trehalosa dimicolato en sí mismo. Azuma y col. (1988) muestra que la administración de trehalosa dimicolato se correlaciona con aumento de la resistencia a infección por virus de la gripe en ratones. Puede prepararse trehalosa dimicolato como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.579.945.

Agentes anfipáticos y tensioactivos, por ejemplo, saponina y derivados tales como QS21 (Cambridge Biotech), forman otro grupo más de adyuvantes preferidos para su uso con los inmunógenos de la presente invención. También pueden emplearse tensioactivos de copolímero en bloque no iónicos (Rabinovich y col., 1994; Hunter y col., 1991). Los oligonucleótidos, como se describen por Yamamoto y col. (1988) son otro grupo útil de adyuvantes. Quil A y lentinen también son adyuvantes preferidos.

También se contemplan superantígenos para su uso como adyuvantes en la presente invención. Los "superantígenos" son en general productos bacterianos que estimulan una mayor proporción de linfocitos T que los antígenos peptídicos sin un requisito de procesamiento antigénico (Mooney y col., 1994). Los superantígenos incluyen exoproteínas de *Staphylococcus* tales como la enterotoxinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  de *S. aureus* y *S. epidermidis*, y las exotoxinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  de *E. coli*.

Las enterotoxinas de *Staphylococcus* habituales se conocen como enterotoxina estafilocócica A (SEA) y enterotoxina estafilocócica B (SEB), estando descritas las enterotoxinas hasta E (SEE) (Rott y col., 1992). *Streptococcus pyogenes* B (SEB), enterotoxina de *Clostridium perfringens* (Bowness y col., 1992), proteína asociada a membrana citoplasmática (CAP) de *S. pyogenes* (Sato y col., 1994) y la toxina de síndrome de choque tóxico 1 (TSST-1) de *S. aureus* (Schwab y col., 1993) son superantígenos útiles adicionales.

Un grupo de adyuvantes particularmente preferidos para su uso en la invención son las endotoxinas detoxificadas, tales como la endotoxina detoxificada refinada de la Patente de Estados Unidos N° 4.866.034. Estas endotoxinas detoxificadas refinadas son eficaces para producir respuestas adyuvantes en mamíferos.

Las endotoxinas detoxificadas pueden combinarse con otros adyuvantes. Se contempla la combinación de endotoxinas detoxificadas con trehalosa dimicolato, como se describe en la Patente de Estados Unidos N°

4.435.386. También se contemplan combinaciones de endotoxinas detoxificadas con trehalosa dimicolato y glucolípidos endotóxicos (Patente de Estados Unidos N° 4.505.899), así como combinación de endotoxinas detoxificadas con esqueleto de pared celular (CWS) o CWS y trehalosa dimicolato, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.436.727, 4.436.728 y 4.505.900. También se prevé que las combinaciones de solamente CWS y trehalosa dimicolato, sin endotoxinas detoxificadas son útiles, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.520.019.

MPL es actualmente un agente inmunopotenciador preferido para su uso en el presente documento. Las referencias que se refieren a los usos de MPL incluyen Tomai y col. (1987), Chen y col. (1991) y Garg y Subbarao (1992), que se refieren cada una a ciertos papeles de MPL en las reacciones de ratones envejecidos; Elliott y col. (1991), que se refiere al ratón cargado con D-galactosamina y su sensibilidad potenciada a lipopolisacárido y MPL; Chase y col. (1986), que se refiere a infecciones bacterianas; y Masihi y col. (1988), que describe los efectos de MPL y endotoxina en la resistencia de ratones a *Toxoplasma gondii*. Fitzgerald (1991) también indicó el uso de MPL para regular positivamente la inmunogenicidad de una vacuna para la sífilis y para impartir protección significativa frente a infección de presentación en conejos.

Por lo tanto se sabe que MPL es seguro para su uso, como se muestra en los sistemas de modelo anteriores. Los ensayos clínicos de fase I también han mostrado que MPL es seguro para su uso (Vosika y col., 1984). De hecho, se sabe que 100 µg/m<sup>2</sup> es seguro para su uso humano, incluso basándose en un paciente externo (Vosika y col., 1984).

MPL generalmente induce activación de linfocitos B policlonales (Baker y col., 1994) y se ha mostrado que aumenta la producción de anticuerpos en muchos sistemas, por ejemplo, en ratones inmunológicamente inmaduros (Baker y col., 1988); en ratones envejecidos (Tomai y Johnson, 1989); y en ratones desnudos Xid (Madonna y Vogel, 1986; Myers y col., 1995). Se ha mostrado que la producción de anticuerpos frente a eritrocitos (Hraba y col., 1993); antígenos independientes y dependientes de linfocitos T; vacuna inmune a Pnu (Garg y Subbarao, 1992); antígenos asociados con tumor aislado (Patente de Estados Unidos 4.877.611); contra células tumorales singénicas (Livingston y col., 1985; Ravindranath y col., 1994a;b); y contra gangliósidos asociados con tumor (Ravindranath y col., 1994a;b).

Otro atributo útil de MPL es que aumenta las respuestas de IgM, como se muestra en Baker y col. (1988a), que describe la capacidad de MPL para aumentar las respuestas de anticuerpos en ratones jóvenes. Esta es una característica particularmente útil de un adyuvante para su uso en ciertas realizaciones de la presente invención. Myers y col. (1995) indicó recientemente la capacidad de MPL para inducir anticuerpos IgM, en virtud de la producción de anticuerpos independiente de linfocitos T.

En los estudios de Myers y col. (1995), MPL se conjugó con el hapteno TNP. Se propuso MPL para su uso como un vehículo para otros haptenos, tales como péptidos.

MPL también activa y recluta macrófagos (Verma y col., 1992). Tomai y Johnson (1989) mostró que los linfocitos T estimulados con MPL potencian la secreción de IL-1 por macrófagos. También se sabe que MPL activa la producción de superóxido, actividad de lisozimas, fagocitosis y muerte de *Candida* en macrófagos peritoneales murinos (Chen y col., 1991).

Los efectos de MPL en linfocitos T incluyen la producción endógena de factores citotóxicos, tales como TNF, en suero de ratones sensibilizados con BCG por MPL (Bennett y col., 1988). Kovach y col. (1990) y Elliot y col. (1991) también muestra que MPL induce actividad de TNF. Se sabe que MPL actúa con TNF-α para inducir la liberación de IFN-γ por células NK. La producción de IFN-γ por linfocitos T en respuesta a MPL también se documentó por Tomai y Johnson (1989), y Odean y col. (1990).

También se sabe que MPL es un adyuvante de linfocitos T potente. Por ejemplo, MPL estimula la proliferación de CTL específicos de antígeno de melanoma (Mitchell y col., 1988, 1993). Además, Baker y col. (1988b) mostró que MPL no tóxico inactivaba la actividad de linfocitos T supresores. De forma natural, en el ambiente fisiológico, la inactivación de linfocitos T supresores permite un mayor beneficio para el animal, obtenido por, por ejemplo, aumento en la producción de anticuerpos. Johnson y Tomai (1988) han indicado los posibles mediadores celulares y moleculares de la acción adyuvante de MPL.

También se sabe que MPL induce la agregación de plaquetas y fosforila una proteína plaquetaria antes de la inducción de secreción de serotonina (Grabarek y col., 1990). Este estudio muestra que MPL está implicado en la activación de proteína quinasa C y la transducción de señal.

Muchos artículos se refieren a la estructura y función de MPL. Estos incluyen Johnson y col. (1990), que describe la caracterización estructural de homólogos de MPL obtenidos de lipopolisacárido Re595 de *Salmonella Minnesota*. El trabajo de Johnson y col. (1990), junto con Grabarek y col. (1990), muestra que los restos de ácido graso de MPL pueden variar, incluso en especies comerciales. Al separar MPL en ocho fracciones por cromatografía de capa fina, Johnson y col. (1990) descubrió que tres eran particularmente activas, según se evaluó usando respuestas plaquetarias humanas. Los componentes químicos de las diversas especies de MPL se caracterizaron por Johnson y col. (1990).

5 Baker y col. (1992) analizó adicionalmente las características estructurales que influyen en la capacidad del lípido A y sus análogos para anular la expresión de la actividad de linfocitos T supresores. Indicaron que la reducción del número de grupos fosfato en el lípido A de dos a uno (es decir, creación de monofosforil lípido A, MPL) así como la reducción del contenido de acilo graso, principalmente retirando el resto en la posición 3, dio como resultado una reducción progresiva de la toxicidad; sin embargo, estas modificaciones estructurales no influyeron en su capacidad para anular la expresión de función de Ts (Baker y col., 1992). Estos tipos de MPL son ideales para su uso en la presente invención.

10 Baker y col. (1992) también mostró que reducir el contenido de acilo graso de cinco a cuatro (precursor de lípido A IV<sub>A</sub> o I<sub>a</sub>) eliminó la capacidad para influir en la función de Ts pero no para inducir la activación policlonal de linfocitos B. Estos estudios muestran que para poder anular la expresión de función de Ts, el lípido A debe ser un disacárido de glucosamina; puede tener uno o dos grupos fosfato y debe tener al menos cinco grupos de acilo graso. Además, la longitud de cadena del ácido graso no hidroxilado, así como la localización de grupos aciloxiacilo (posición 2' frente a 3'), pueden desempeñar un papel importante (Baker y col., 1992).

15 Al examinar la relación entre longitud de cadena y posición de grupos acilo grasos en la capacidad del lípido A para anular la expresión de la actividad de linfocitos T supresores (Ts), Baker y col. (1994) descubrió que las longitudes de cadena de acilo graso de C<sub>12</sub> a C<sub>14</sub> parecían ser óptimas para la bioactividad. Por lo tanto, aunque su uso aún es posible, las preparaciones de lípido A con grupos de acilo graso de longitud de cadena relativamente corta (C<sub>10</sub> a C<sub>12</sub> de *Pseudomonas aeruginosa* y *Chromobacterium violaceum*) o longitud de cadena predominantemente larga (C<sub>18</sub> de *Helicobacter pylori*) se prefieren menos para su uso en la presente invención.

20 Baker y col. (1994) también mostró que los oligosacáridos de la región central interior proximal del lípido A de algunos lipopolisacáridos bacterianos aumentan la expresión de actividad de Ts; debido principalmente a la capacidad de tales oligosacáridos, que se conservan relativamente en estructura entre bacterias gram negativas, para aumentar o expandir en la población de Ts CD8<sup>+</sup> generada durante el transcurso de una respuesta de anticuerpos normal a antígenos microbianos no relacionados. Se indicó que la estructura mínima requerida para la expresión de la inmunosupresión añadida observada era un hexasacárido que contenía un resto de 2-ceto-3-desoxioctonato, dos restos de glucosa y tres restos de heptosa a los que se unen dos grupos de pirofosforiletanolamina (Baker y col., 1994). Esta información puede considerarse al utilizar o incluso diseñar adyuvantes adicionales para su uso en la invención.

25 En una línea de trabajo relacionada en general, Tanamoto y col. (1994a;b; 1995) describió la disociación de actividades endotóxicas en un precursor de lípido A sintetizado químicamente después de acetilación o succinilación. Por lo tanto, compuestos tales como "acetilo 406" y "succinilo 516" (Tanamoto y col., 1994a;b; 1995) también se contemplan para su uso en la invención.

30 Los MPL sintéticos forman un grupo particularmente preferido de antígenos. Por ejemplo, Brade y col. (1993) describió un glucoconjugado artificial que contenía la cadena principal de disacárido de glucosamina bifosforilado de Lípido A que se une a Mab anti-Lípido A. Este es un candidato para su uso en ciertos aspectos de la invención.

35 Los derivados de MPL descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.987.237 se contemplan particularmente para su uso en la presente invención. La Patente de Estados Unidos N° 4.987.237 describe derivados de MPL que contienen uno o más grupos libres, tales como aminas, en una cadena lateral unida a los grupos hidroxilo primarios del núcleo de monofosforil lípido A a través de un grupo éster. Los derivados proporcionan un procedimiento conveniente para acoplar el lípido A a través de agentes de acoplamiento a diversos materiales biológicamente activos. Las propiedades inmunoestimulantes del lípido A se mantienen. Todos los derivados de MPL de acuerdo con la Patente de Estados Unidos N° 4.987.237 se contemplan para su uso en las células incorporadas con adyuvante de MPL de la presente invención.

40 Diversos adyuvantes, incluso los que no se usan habitualmente en seres humanos, pueden aun emplearse en animales, cuando, por ejemplo, se desea inducir anticuerpos u obtener posteriormente linfocitos T activados. La toxicidad u otros efectos adversos que pueden resultar del adyuvante o las células, por ejemplo, como puede producirse usando células tumorales no irradiadas, es irrelevante en tales circunstancias.

45 Dentro de las vacunas proporcionadas en el presente documento, la composición adyuvante se diseña preferentemente para inducir una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Altos niveles de citocinas del tipo Th1 (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 y IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno administrado. Por el contrario, niveles altos de citocinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales. Tras la aplicación de una vacuna como se proporciona en el presente documento, un paciente soportará una respuesta inmune que incluye respuestas de tipo Th1 y Th2. Dentro de una realización preferida, en la que una respuesta es predominantemente de tipo Th1, el nivel de citocinas de tipo Th1 aumentará en mayor medida que el nivel de citocinas de tipo Th2. Los niveles de estas citocinas pueden evaluarse fácilmente usando ensayos convencionales. Para una revisión de las familias de citocinas véase por ejemplo, Mosmann y Coffman (1989).

55 Los adyuvantes preferidos para su uso en la inducción de una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen,

por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), junto con una sal de aluminio. Están disponibles adyuvantes de MPL de Corixa Corporation (Seattle, WA; véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094, cada uno de los cuales se incorpora específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta predominantemente Th1. Tales oligonucleótidos se conocen bien y se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 96/02555 y Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 99/33488. También se describen secuencias de ADN inmunoestimuladoras, por ejemplo, por Sato y col. (1996). Otro adyuvante preferido es una saponina, preferentemente QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), que puede usarse sola o en combinación con otros adyuvantes. Por ejemplo, un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A y derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y 3D-MPL (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/00153), o un compuesto menos reactogénico en el que QS21 se interrumpe con colesterol (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 96/33739). Otras formulaciones preferidas comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. También se ha descrito una formulación adyuvante particularmente potente que incluye QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión en aceite en agua (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 95/17210).

Otros adyuvantes preferidos incluyen Montanide ISA 720 (Seppic), SAF (Chiron), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie SBAS de adyuvantes (por ejemplo, SBAS-2 o SBAS-4, disponibles de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Detox (Corixa Corporation), RC-529 (Corixa Corporation) y aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGP).

Cualquier vacuna proporcionada en el presente documento puede prepararse usando procedimientos bien conocidos que dan como resultado una combinación de uno o más antígenos, uno o más inmunoestimuladores o adyuvantes y uno o más vehículos, excipientes o tampones farmacéuticamente aceptables adecuados. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse como parte de una formulación de liberación prolongada (es decir, una formulación tal como una cápsula, esponja o gel [compuesta de polisacáridos, por ejemplo] que efectúa una liberación lenta del compuesto después de la administración). Tales formulaciones pueden prepararse generalmente usando tecnología bien conocida (Coombes y col., 1996) y administrarse por, por ejemplo, implantación oral, rectal o subcutánea o por implantación en el sitio diana deseado. Las formulaciones de liberación prolongada pueden contener un péptido, polinucleótido o anticuerpo dispersado en una matriz de vehículo y/o contenidas dentro de un depósito rodeado por una membrana controladora de la velocidad.

Los vehículos para su uso dentro de tales formulaciones son preferentemente biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferentemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación de componente activo. Tales vehículos incluyen micropartículas de poli(láctida-co-glicolida), así como poliacrilato, látex, almidón, celulosa y dextrano. Otros vehículos de liberación prolongada incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un núcleo hidrófilo no líquido (por ejemplo, un polisacárido u oligosacárido reticulado) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifílico, tal como un fosfolípido (Patente de Estados Unidos N° 5.151.254; Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/20078; Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO/94/23701; y Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenido dentro de una formulación de liberación prolongada depende del sitio de implantación, la tasa y duración esperada de liberación y la naturaleza de la afección a tratar o prevenir.

Cualquiera de una diversidad de vehículos de suministro puede emplearse dentro de composiciones farmacéuticas y vacunas para facilitar la producción de una respuesta inmune específica de antígeno que se dirige a células tumorales. Los vehículos de suministro incluyen células presentadoras de antígenos (APC), tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, monocitos y otras células que pueden modificarse por ingeniería genética para ser APC eficaces. Tales células pueden, pero no necesitan, modificarse genéticamente para aumentar la capacidad de presentación del antígeno, para mejorar la activación y/o mantenimiento de la respuesta a linfocitos T, para tener efectos antitumorales por sí mismas y/o para ser inmunológicamente compatibles con el receptor (es decir, haplotipo de HLA coincidente). Las APC pueden generalmente aislarse de cualquiera de una diversidad de fluidos y órganos biológicos, incluyendo tejidos tumorales y peritumorales y pueden ser células autólogas, alogénicas, singénicas o xenogénicas.

Ciertas realizaciones preferidas de la presente invención usan células dendríticas o progenitores de las mismas como células presentadoras de antígenos. Las células dendríticas son APC altamente potentes (Banchereau y Steinman, 1998) y se ha mostrado que son eficaces como un adyuvante fisiológico para inducir inmunidad antitumoral terapéutica o profiláctica (Timmerman y Levy, 1999). En general, las células dendríticas pueden identificarse basándose en su forma típica (estrellada *in situ*, con protuberancias citoplasmáticas notables (dendríticas) visibles *in vitro*), su capacidad para captar, procesar y presentar antígenos con alta eficacia y su capacidad para activar respuestas de linfocitos T vírgenes. Las células dendríticas pueden, por supuesto, modificarse por ingeniería genética para expresar receptores o ligandos de superficie celular específicos que no se encuentran habitualmente en células dendríticas *in vivo* o *ex vivo* y tales células dendríticas modificadas se contemplan por la presente invención. Como una alternativa a células dendríticas, pueden usarse células dendríticas cargadas con antígeno de vesículas secretadas (denominadas exosomas) dentro de una vacuna (Zitvogel y col., 1998).

Pueden obtenerse células dendríticas y progenitores de sangre periférica, médula ósea, células que se infiltran en tumores, células que se infiltran en tejidos peritumorales, ganglios linfáticos, bazo, piel, sangre del cordón umbilical o cualquier otro tejido o fluido adecuado. Por ejemplo, las células dendríticas pueden diferenciarse *ex vivo* añadiendo una combinación de citocinas tales como GM-CSF, IL-4, IL-13 y/o TNF $\alpha$  a cultivos de monocitos recogidos de sangre periférica. Como alternativa, las células positivas para CD34 recogidas en sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea pueden diferenciarse en células dendríticas añadiendo al medio de cultivo combinaciones de GM-CSF, IL-3, TNFa, ligando de CD40, LPS, ligando de flt3 y/u otro compuesto o compuestos que inducen diferenciación, maduración y proliferación de células dendríticas.

Las células dendríticas se categorizan convenientemente como células "inmaduras" y "maduras", lo que permite un modo sencillo de diferenciar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no debería interpretarse como excluyente de todas las posibles etapas intermedias de diferenciación. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan como APC con una alta capacidad de captación y procesamiento de antígenos, que se correlaciona con la alta expresión del receptor de Fc $\gamma$  y el receptor de manosa. El fenotipo maduro se caracteriza típicamente por una expresión menor de estos marcadores, pero una alta expresión de moléculas de superficie celular responsables de la activación de linfocitos T tales como MHC de clase I y clase II, moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54 y CD11) y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD40, CD80, CD86 y 4-1BB).

Las APC pueden generalmente transfectarse con un polinucleótido que codifica un péptido relacionado con tumor maligno hematológico, de modo que el péptido o una parte inmunogénica del mismo, se expresa en la superficie celular. Dicha transfección puede tener lugar *ex vivo*, y puede usarse después una composición o vacuna que comprenda tales células transfectadas para fines terapéuticos, como se ha descrito en el presente documento. Como alternativa, puede administrarse un vehículo de suministro génico que se dirija a una célula dendrítica u otra célula presentadora de antígenos a un paciente, dando como resultado transfección que se produce *in vivo*. La transfección *in vivo* y *ex vivo* de células dendríticas, por ejemplo, puede generalmente realizarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N $^{\circ}$  WO 97/24447, o el enfoque de pistola génica descrito por Mahvi y col. (1997). La carga antigénica de células dendríticas puede conseguirse incubando células dendríticas o células progenitoras con el péptido relacionado con el tumor maligno hematológico, ADN (desnudo o dentro de un vector plasmídico) o ARN; o con bacteria o virus recombinante que expresa el antígeno (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar, adenovirus o vectores de lentivirus). Antes de cargar, el péptido puede conjugarse covalentemente con un compañero inmunológico que proporciona ayuda a linfocito T (por ejemplo, una molécula vehículo). Como alternativa, puede pulsarse una célula dendrítica con un compañero inmunológico no conjugado, de forma separada o en presencia del péptido.

También se contemplan agentes terapéuticos combinados y puede emplearse el mismo tipo de composiciones farmacéuticas subyacentes para medicamentos tanto sencillos como combinados. Pueden presentarse vacunas y composiciones farmacéuticas en recipientes de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas selladas o viales. Tales recipientes están preferentemente herméticamente sellados para conservar la esterilidad de la formulación hasta su uso. En general, las formulaciones pueden almacenarse como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. Como alternativa, una vacuna o composición farmacéutica puede almacenarse en una condición liofilizada que requiere solamente la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

#### 4.5 Procedimientos de diagnóstico y pronóstico para enfermedades de neoplasias hematológicas

La presente invención proporciona adicionalmente procedimientos para detectar una enfermedad maligna asociada con una o más de las composiciones polipeptídicas o polinucleotídicas desveladas en el presente documento y para controlar la eficacia de una inmunización o terapia para una enfermedad tal. Para determinar la presencia o ausencia de una enfermedad maligna asociada con una o más de las composiciones polipeptídicas o polinucleotídicas desveladas en el presente documento, un paciente puede ensayarse con respecto al nivel de linfocitos T específicos para una o más de tales composiciones. Dentro de ciertos procedimientos, una muestra biológica que comprende linfocitos T CD4 $^{+}$  y/o CD8 $^{+}$  aislados de un paciente se incuba con una o más de las composiciones polipeptídicas o polinucleotídicas desveladas en el presente documento y/o una APC que expresa uno o más de tales péptidos o polipéptidos y la presencia o ausencia de activación específica de linfocitos T se detecta, como se ha descrito en el presente documento. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, linfocitos T aislados. Por ejemplo, los linfocitos T pueden aislarse de un paciente por técnicas rutinarias (tales como por centrifugación de gradiente de densidad de Ficoll/Hypaque de linfocitos de sangre periférica). Pueden incubarse linfocitos T *in vitro* durante 2-9 días (típicamente 4 días) a 37 °C con una o más de las composiciones peptídicas, polipeptídicas o polinucleotídicas desveladas (por ejemplo, 5-25  $\mu$ g/ml). Puede ser deseable incubar otra alícuota de una muestra de linfocitos T en ausencia de la composición para actuar como un control. Para los linfocitos T CD4 $^{+}$ , la activación se detecta preferentemente evaluando la proliferación de los linfocitos T. Para linfocitos T CD8 $^{+}$ , la activación se detecta preferentemente evaluando la actividad citolítica. Un nivel de proliferación que es al menos dos veces mayor y/o un nivel de actividad citolítica que es al menos un 20 % mayor que en pacientes sin enfermedad indica la presencia de una enfermedad maligna asociada con expresión de una o más de las composiciones polipeptídicas o polinucleotídicas desveladas. Puede analizarse una correlación adicional, usando procedimientos bien conocidos en la técnica, entre el nivel de proliferación y/o actividad citolítica y la respuesta predicha a terapia. En particular, puede esperarse que los pacientes que presentan una mayor respuesta de anticuerpos, proliferativa y/o lítica muestren una mayor respuesta a terapia.

Dentro de otros procedimientos, una muestra biológica obtenida de un paciente se ensaya con respecto al nivel de anticuerpo específico para uno o más de los péptidos o polipéptidos relacionados con tumor maligno hematológico desvelados en el presente documento. La muestra biológica se incuba con péptido o polipéptido relacionado con tumor maligno hematológico o un polinucleótido que codifica un péptido o polipéptido tal y/o una APC que expresa dicho péptido o polipéptido en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que se formen inmunocomplejos. Los inmunocomplejos formados entre el péptido o polipéptido seleccionado y los anticuerpos en la muestra biológica que se unen específicamente al péptido o polipéptido seleccionado se detectan después. Una muestra biológica para su uso dentro de tales procedimientos puede ser cualquier muestra obtenida de un paciente que se esperaría que contuviera anticuerpos. Las muestras biológicas adecuadas incluyen sangre, sueros, líquido ascítico, médula ósea, efusión pleural y fluido cerebroespinal.

La muestra biológica se incuba con el péptido o polipéptido seleccionado en una mezcla de reacción en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que se formen inmunocomplejos entre el péptido o polipéptido seleccionado y anticuerpos que son inespecíficos para un péptido o polipéptido tal. Por ejemplo, una muestra biológica y un péptido o polipéptido seleccionado puede incubarse a 4 °C durante 24-48 horas.

Después de la incubación, la mezcla de reacción se ensaya con respecto a la presencia de inmunocomplejos. La detección de inmunocomplejos formados entre el péptido o polipéptido seleccionado y anticuerpos presentes en la muestra biológica pueden conseguirse por una diversidad de técnicas conocidas, tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA). Los ensayos adecuados se conocen bien en la técnica y se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes (Harlow y Lane, 1988). Los ensayos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación la técnica de inmunoensayo de tipo sándwich de anticuerpo monoclonal doble (Patente de Estados Unidos N° 4.376.110); ensayos de tipo sándwich de anticuerpo monoclonal-policlonal (Wide y col., 1970); el procedimiento de "transferencia de western" (Patente de Estados Unidos N° 4.452.901); inmunoprecipitación de ligando marcado (Brown y col., 1980); ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (Raines y Ross, 1982); técnicas inmunocitoquímicas, incluyendo el uso de fluorocromos (Brooks y col., 1980); y neutralización de actividad (Bowen-Pope y col., 1984). Otros inmunoensayos incluyen, pero sin limitación, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876.

Para fines de detección, el péptido o polipéptido seleccionado puede estar marcado o no marcado. El péptido polipeptídico no marcado puede usarse en ensayos de aglutinación o en combinación con reactivos de detección marcados que se unen a los inmunocomplejos (por ejemplo, antiinmunoglobulina, proteína G, Proteína A o una lectina y anticuerpos secundarios o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, capaces de unirse a los anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido o péptido relacionado con tumor maligno hematológico). Si el péptido o polipéptido seleccionado se marca, el grupo indicador puede ser cualquier grupo indicador adecuado conocido en la técnica, incluyendo radioisótopos, grupos fluorescentes, grupos luminiscentes, enzimas, biotina y partículas colorantes.

Dentro de ciertos ensayos, el péptido o polipéptido no marcados se inmovilizan en un soporte sólido. El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos en la materia al que pueda unirse el péptido. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un pocillo de ensayo en una placa de microtitulación o una membrana de nitrocelulosa u otra adecuada. Como alternativa, el soporte puede ser una perla o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tal como los desvelados en la Patente de Estados Unidos N° 5.359.681. El péptido puede inmovilizarse en el soporte sólido usando una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia, que se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica. En el contexto de la presente invención, el término "inmovilización" se refiere tanto a asociación no covalente, tal como adsorción, como a unión covalente (que puede ser un engarce directo entre el antígeno y grupos funcionales en el soporte o puede ser un engarce por medio de un agente de reticulación). Se prefiere inmovilización por adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana. En tales casos, la adsorción puede conseguirse poniendo en contacto el péptido o polipéptido seleccionado, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante una cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero está típicamente entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 1 día. En general, poner en contacto un pocillo de una placa de microtitulación de plástico (tal como poliestireno o cloruro de polivinilo) con una cantidad de péptido que varía de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 10 µg y preferentemente de 100 ng a aproximadamente 1 µg es suficiente para inmovilizar una cantidad adecuada de péptido.

Después de la inmovilización, los sitios de unión a proteína restantes en el soporte típicamente se bloquean. Puede usarse cualquier agente de bloqueo adecuado conocido por los expertos en la materia, tal como albúmina de suero bovino, Tween™ 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), suero de cabra normal inactivado por calor (NGS), o BLOTTO (solución tamponada de leche en polvo sin grasa que también contiene un conservante, sales y un agente antiespumante). El soporte se incuba después con una muestra biológica sospechosa de contener anticuerpo específico. La muestra puede aplicarse pura o, más frecuentemente, puede diluirse, habitualmente en una solución tamponada que contiene una cantidad pequeña (0,1 %-5,0 % en peso) de proteína, tal como BSA, NGS o BLOTTO. En general, un tiempo de contacto (es decir, tiempo de incubación) apropiado es un periodo de tiempo que es suficiente para detectar la presencia de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que es inmunoespecífico

para el péptido o polipéptido seleccionado dentro de una muestra que contiene un anticuerpo tal o fragmento de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el tiempo de contacto es suficiente para conseguir un nivel de unión que es al menos 95 % del conseguido en equilibrio entre anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido y no unido. Los expertos habituales en la materia reconocerán que el tiempo necesario para conseguir el equilibrio puede determinarse fácilmente ensayando el nivel de unión que se produce durante un periodo de tiempo. A temperatura ambiente, un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos generalmente es suficiente.

Después puede retirarse la muestra no unida lavando soporte sólido con un tampón apropiado, tal como PBS que contiene Tween™ 20 0,1 %. Después puede añadirse un reactivo de detección que se une a los inmunocomplejos y que comprende al menos un primer marcador detectable o molécula "indicadora". El reactivo de detección se incuba con el inmunocomplejo durante una cantidad de tiempo suficiente para detectar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo unido. Una cantidad de tiempo apropiado puede generalmente determinarse ensayando el nivel de unión que se produce a lo largo de un periodo de tiempo. El marcador o reactivo de detección no unido se retira después y el marcador o reactivo de detección unido se detecta usando un ensayo o instrumento analítico adecuado. El procedimiento empleado para detectar el grupo indicador depende de la naturaleza del grupo indicador. Para marcadores radiactivos, los procedimientos de conteo de centelleo o autorradiográficos son generalmente apropiados. Pueden usarse procedimientos espectroscópicos para detectar colorantes, restos luminiscentes o quimioluminiscentes y diversos cromógenos, marcadores fluorescentes y similares. La biotina puede detectarse usando avidina, acoplada a un grupo indicador diferente (habitualmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos indicadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa) pueden detectarse generalmente mediante la adición de sustrato (generalmente durante un periodo específico de tiempo), seguido de análisis espectroscópico o de otro tipo de los productos de reacción. Independientemente del procedimiento específico empleado, un nivel de reactivo de detección unido que es al menos dos veces mayor que el fondo (es decir, el nivel observado para una muestra biológica obtenida de un individuo sin enfermedad) indica la presencia de una enfermedad maligna asociada con la expresión del péptido o polipéptido seleccionado.

En general, los procedimientos para controlar la eficacia de una inmunización o terapia implican controlar cambios en el nivel de anticuerpos o linfocitos T específicos para el péptido o polipéptido seleccionado en una muestra o en un animal tal como un paciente humano. Los procedimientos en los que los niveles de anticuerpo se controlan pueden comprender las etapas de: (a) incubar una primera muestra biológica, obtenida de un paciente antes de una terapia o inmunización, con un péptido o polipéptido seleccionado, en la que la incubación se realiza en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que se formen inmunocomplejos; (b) detectar inmunocomplejos formados entre el péptido o polipéptido seleccionado y anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno en la muestra biológica que se unen específicamente al péptido o polipéptido seleccionado; (c) repetir las etapas (a) y (b) usando una segunda muestra biológica tomada del paciente en un momento posterior, tal como por ejemplo, después una terapia o inmunización dada; y (d) comparar el número de inmunocomplejos detectados en la primera y segunda muestras biológicas. Como alternativa, puede emplearse un polinucleótido que codifica el péptido o polipéptido seleccionado o una APC que expresa el péptido o polipéptido seleccionado en lugar del péptido o polipéptido seleccionado en sí mismo. Dentro de tales procedimientos, se detectan inmunocomplejos entre el péptido o polipéptido seleccionado codificado por el polinucleótido, o expresado por la APC, y anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno en la muestra biológica.

Los procedimientos en los que la activación de linfocitos T y/o el número de precursores específicos de polipéptidos de tumor maligno hematológico se controlan pueden comprender las etapas de: (a) incubar una primera muestra biológica que comprende células  $CD4^+$  y/o  $CD8^+$  (por ejemplo, médula ósea, sangre periférica o una fracción de las mismas), obtenida de un paciente antes de una terapia o inmunización, con un péptido o polipéptido de tumor maligno hematológico, en el que la incubación se realiza en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la activación específica, proliferación y/o lisis de linfocitos T; (b) detectar una cantidad de activación, proliferación y/o lisis de los linfocitos T; (c) repetir las etapas (a) y (b) usando una segunda muestra biológica que comprende linfocitos T  $CD4^+$  y/o  $CD8^+$  y tomada del mismo paciente después de terapia o inmunización; y (d) comparar la cantidad de activación, proliferación y/o lisis de linfocitos T en la primera y segunda muestras biológicas. Como alternativa, puede emplearse un polinucleótido que codifica un péptido relacionado con tumor maligno hematológico o una APC que expresa dicho péptido en lugar del péptido de tumor maligno hematológico en sí mismo.

Una muestra biológica para su uso dentro de tales procedimientos puede ser cualquier muestra obtenida de un paciente que se esperaría que contuviera anticuerpos, linfocitos T  $CD4^+$  y/o linfocitos T  $CD8^+$ . Las muestras biológicas adecuadas incluyen sangre, sueros, líquido ascítico, médula ósea, efusión pleural y fluido cerebroespinal. Puede obtenerse una primera muestra biológica antes del inicio de terapia o inmunización o en mitad de un régimen de vacunación o terapia. La segunda muestra biológica debería obtenerse de una manera similar, pero en un momento después de terapia o inmunización adicional. La segunda muestra biológica puede obtenerse a la compleción de, o en mitad de, terapia o inmunización, siempre que al menos una parte de la terapia o inmunización tenga lugar entre el aislamiento de la primera y segunda muestras biológicas.

Las etapas de incubación y detección para ambas muestras pueden realizarse en general como se ha descrito anteriormente. Un aumento estadísticamente significativo del número de inmunocomplejos en la segunda muestra

en relación con la primera muestra refleja una terapia de inmunización exitosa.

#### 4.6 Administración de composiciones y formulaciones farmacéuticas

5 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a formulación de una o más de las composiciones polinucleotídicas, polipeptídicas, peptídicas, de anticuerpo o de fragmento de unión a antígeno desveladas en el presente documento en soluciones farmacéuticamente aceptable para administración a una célula o un animal, solas o en combinación con una o más modalidades adicionales de terapia antineoplásica o en combinación con uno o más agentes de diagnóstico o terapéuticos.

10 También se entenderá que, si se desea, el segmento de ácido nucleico, composiciones de ARN o ADN desveladas en el presente documento pueden administrarse en combinación con otros agentes también, tales como, por ejemplo, proteínas o péptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. Siempre que la composición comprenda al menos una de las construcciones de expresión genética desveladas en el presente documento, no existe virtualmente límite a otros componentes que también puedan incluirse, dado que los agentes adicionales no provocan un efecto adverso significativo tras el contacto con las células diana o tejidos huésped. Las composiciones derivadas de ARN o ADN pueden por lo tanto suministrarse junto con otros diversos agentes según se requiera en el caso particular. Tales composiciones de ARN o ADN pueden purificarse de células huésped u otras fuentes biológicas o, como alternativa, pueden sintetizarse químicamente como se describe en el presente documento. De forma similar, tales composiciones pueden comprender composiciones de ARN o ADN sustituidas o derivatizadas. Tales composiciones pueden incluir una o más construcciones génicas terapéuticas, solas o en combinación con uno o más derivados sustituyentes de ácido nucleico o péptido modificados y/u otros agentes terapéuticos antineoplásicos.

20 La formulación de excipientes farmacéuticamente aceptables y soluciones de vehículo se conocen bien por los expertos en la materia, así como el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para el uso de las composiciones particulares descritas en el presente documento en una diversidad de regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración y formulación oral, intravenosa, intranasal, transdérmica, intraprostática, intratumoral y/o intramuscular.

##### 4.6.1 Administración inyectable

30 Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden administrarse por vía parenteral, vía intravenosa, vía intramuscular o incluso por vía intraperitoneal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.543.158, Patente de Estados Unidos 5.641.515 y Patente de Estados Unidos 5.399.363 (cada una incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad). Las soluciones de los compuestos activos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

40 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (Patente de Estados Unidos 5.466.468, incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y/o aceites vegetales. Puede mantenerse fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede producirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse por el uso de las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

50 Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería tamponarse de forma adecuada si es necesario y el diluyente líquido hacerse primer isotónico con solución salina o glucosa suficientes. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, se conocerán por los expertos en la materia los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, Hoover, 1975). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración humana, las preparaciones deberían cumplir los patrones de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales



requeridos por la Oficina de Patrones Biológicos de la FDA.

5 Pueden prepararse soluciones inyectables incorporando las construcciones de terapia génica en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

10 Las composiciones desveladas en el presente documento pueden formularse en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas farmacéuticas tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares.

20 Como se usa en el presente documento "excipiente" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, tampones, soluciones excipientes, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos complementarios a las composiciones.

#### 25 **4.6.2 Administración intranasal**

30 Pueden usarse soluciones o pulverizaciones nasales, aerosoles o incluso inhalantes para el tratamiento de neoplasias hematológicas con uno o más de los péptidos y polinucleótidos desvelados. Las soluciones nasales son habitualmente soluciones acuosas diseñadas para su administración a los conductos nasales en gotas o pulverizaciones. Las soluciones nasales se preparan de modo que sean similares en muchos aspectos a secreciones nasales, de modo que se mantenga la acción ciliar normal. Por lo tanto, las soluciones nasales acuosas habitualmente son isotónicas y ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Además, pueden incluirse conservantes antimicrobianos, similares a los usados en preparaciones oftálmicas, y estabilizadores farmacológicos apropiados, si se requiere, en la formulación. Se conocen diversas preparaciones nasales comerciales.

35 Las inhalaciones e inhalantes son preparaciones farmacéuticas diseñadas para suministrar un fármaco o compuesto al árbol respiratorio de un paciente. Se administra un vapor o bruma y alcanza el área afectada, con frecuencia para proporcionar alivio de síntomas de congestión bronquial y nasal. Sin embargo, esta ruta también puede emplearse para suministrar agentes al sistema circulatorio. Las inhalaciones pueden administrarse por las rutas respiratorias nasal u oral. La administración de soluciones de inhalación solamente es eficaz si las gotas son suficientemente finas y uniformes en tamaño de modo que la bruma alcance los bronquiolos.

40 Otro grupo de productos, también conocidos como inhalaciones, y en ocasiones denominados insuflaciones, consiste en fármacos líquidos o en polvo fino que se transportan a las vías respiratorias mediante el uso de sistemas de suministro especial, tales como aerosoles farmacéuticos, que mantienen una solución o suspensión del fármaco en un propulsor de gas licuado. Cuando se libera a través de una válvula adecuada y adaptador oral, se propulsa una dosis medida de la inhalación en el tracto respiratorio del paciente.

45 El tamaño de partícula es importante en la administración de este tipo de preparación. Se ha indicado que el tamaño de partícula óptimo para penetración en la cavidad pulmonar es del orden de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 7  $\mu\text{m}$ . Se producen brumas finas por aerosoles presurizados y por lo tanto su uso se considera ventajoso.

#### 50 **4.6.3 Administración mediado por liposomas, nanocápsulas y micropartículas**

55 En ciertas realizaciones, los inventores contemplan el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares para la introducción de las composiciones polinucleotídicas de la presente invención en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones polinucleotídicas de la presente invención pueden formularse para suministro encapsulado en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similares.

Tales formulaciones pueden preferirse para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento. La formación y uso de liposomas se conoce generalmente

por los expertos en la materia (véase por ejemplo, Couvreur y col., 1977; Couvreur, 1988; Lasic, 1998; que describe el uso de liposomas y nanocápsulas en la terapia de antibiótico dirigida para infecciones y enfermedades bacterianas intracelulares). Recientemente, se han desarrollado liposomas con estabilidad en suero y semividas en circulación mejoradas (Gabizon y Papahadjopoulos, 1988; Allen y Choun, 1987; Patente de Estados Unidos 5.741.516, incorporadas específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad). Además, se han revisado diversos procedimientos de liposomas y preparaciones de tipo liposoma como vehículos farmacológicos potenciales (Takakura, 1998; Chandran y col., 1997; Margalit, 1995; Patente de Estados Unidos 5.567.434; Patente de Estados Unidos 5.552.157; Patente de Estados Unidos 5.565.213; Patente de Estados Unidos 5.738.868 y Patente de Estados Unidos 5.795.587, cada una incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

Se han usado liposomas de forma exitosa con varios tipos celulares que normalmente son resistentes a transfección por otros procedimientos incluyendo suspensiones de linfocitos T, principalmente cultivos de hepatocitos y células PC12 (Renneisen y col., 1990; Muller y col., 1990). Además, los liposomas no tienen las restricciones de longitud de ADN que son típicas de sistemas de suministro basados en virus. Los liposomas se han usado eficazmente para introducir genes, fármacos (Heath y Martin, 1986; Heath y col., 1986; Balazsovits y col., 1989; Fresta y Puglisi, 1996), agentes radioterapéuticos (Pikul y col., 1987), enzimas (Imaizumi y col., 1990a; Imaizumi y col., 1990b), virus (Faller y Baltimore, 1984), factor de transcripción y efectores alostéricos (Nicolau y Gersonde, 1979) en una diversidad de líneas celulares cultivadas y animales. Además, se han completado varios ensayos clínicos exitosos que examinan la eficacia del suministro de fármacos mediado por liposomas (Lopez-Berestein y col., 1985a; 1985b; Coune, 1988; Sculier y col., 1988). Además, varios estudios sugieren que el uso de liposomas no está asociado con respuestas autoinmunes, toxicidad o localización en las gónadas después de suministro sistémico (Mori y Fukatsu, 1992).

Se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de MLV da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el centro.

Los liposomas se asemejan a las membranas celulares y se contemplan para su uso en relación con la presente invención como vehículos para las composiciones peptídicas. Son ampliamente adecuados puesto que pueden atrapar sustancias tanto solubles en agua como en lípidos, es decir en los espacios acuosos y dentro de la bicapa en sí misma, respectivamente. Es posible que los liposomas que portan fármacos puedan emplearse para suministro específico de sitio de agentes activos modificando selectivamente la formulación del liposoma.

Además de las enseñanzas de Couvreur y col. (1977; 1988), la siguiente información puede utilizarse en la generación de formulaciones liposomales. Los fosfolípidos pueden formar una diversidad de estructuras distintas de liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la relación molar de lípido a agua. A relaciones bajas el liposoma es la estructura preferida. Las características físicas de liposomas dependen del pH, fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a elevadas temperaturas experimentan una transición de fase que altera notablemente su permeabilidad. La transición de fase implica un cambio de una estructura ordenada estrechamente empaquetada, conocida como el estado de gel, a una estructura menos ordenada empaquetada con flexibilidad, conocida como el estado fluido. Esto sucede a una temperatura característica de transición de fase y da como resultado un aumento de la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Como alternativa, la invención proporciona formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones polinucleotídicas de la presente invención. Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de un modo estable y reproducible (Henry-Michelland y col., 1987; Quintanar-Guerrero y col., 1998; Douglas y col., 1987). Para evitar los efectos secundarios debido a sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de un tamaño de aproximadamente 0,1 µm) deberían diseñarse usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Se contemplan nanopartículas de polialquilo-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos para su uso en la presente invención y tales partículas pueden realizarse fácilmente, como se ha descrito (Couvreur y col., 1980; 1988; zur Muhlen y col., 1998; Zambaux y col. 1998; Pinto-Alphandry y col., 1995 y Patente de Estados Unidos 5.145.684, incorporadas específicamente en la presente memoria por referencia en su totalidad). En particular, se contempla también particularmente que los procedimientos de suministro de polinucleótidos a una célula diana usando nanopartículas o nanoesferas (Schwab y col., 1994; Truong-Le y col., 1998) son útiles en la formulación de las composiciones desveladas para administración a un animal y a un ser humano en particular.

#### 4.7 Agentes y kits terapéuticos

La invención también proporciona una o más de las composiciones relacionadas con tumor maligno hematológico formuladas con uno o más excipientes, vehículos, diluyentes, adyuvantes y/u otros componentes farmacéuticamente aceptables para su uso en la preparación de medicamentos, o reactivos de diagnóstico, así como diversos kits que comprenden una o más de tales composiciones, medicamentos o formulaciones pretendidas para administración a un animal que lo necesite o para su uso en uno o más ensayos de diagnóstico para identificar polinucleótidos,

polipéptidos y/o anticuerpos que son específicos para uno o más compuestos relacionados con tumor maligno hematológico como se describe en el presente documento. Además de los epítomos, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno desvelados, pueden emplearse polinucleótidos que codifican fragmentos de unión a antígeno o anticuerpos o agentes antineoplásicos adicionales, polinucleótidos, péptidos, antígenos u otros compuestos terapéuticos en la formulación de composiciones particulares y formulaciones desveladas en el presente documento y particularmente en la preparación de agentes antineoplásicos o terapias de anti neoplasias hematológicas para administración al mamífero afectado.

Como tal, los animales preferidos para administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento incluyen mamíferos y particularmente seres humanos. Otros animales preferidos incluyen primates, ovejas, cabras, bovinos, equinos, porcinos, lupinos, caninos y felinos, así como cualquier otra especie de mamífero habitualmente considerada mascota, ganado o especies animales comercialmente relevantes. Las composiciones y formulaciones pueden incluir composiciones polipeptídicas, polinucleotídicas o de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno parcial o significativamente purificadas, solas o en combinación con uno o más principios activos adicionales, agentes antineoplásicos, vacunas, adyuvantes u otros agentes terapéuticos que pueden obtenerse de fuentes naturales o recombinantes o que pueden obtenerse de forma natural o sintetizarse químicamente o producirse como alternativa *in vitro* a partir de células huésped recombinantes que expresan uno o más segmentos de ácido nucleico que codifican uno o más de tales principios activos, vehículos, adyuvantes, cofactores u otros compuestos terapéuticos adicionales.

#### 4.8 Reactivos y kits de diagnóstico

La invención proporciona adicionalmente reactivos y kits de diagnóstico que comprenden uno o más de tales reactivos para su uso en una diversidad de ensayos de diagnóstico, incluyendo por ejemplo, inmunoensayos tales como ELISA e inmunoensayos de tipo "sándwich". Tales kits pueden incluir preferentemente al menos un primer péptido o un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención, un fragmento funcional del mismo o un cóctel de los mismos y un medio para la generación de señal. Los componentes del kit pueden preunirse a un soporte sólido o pueden aplicarse a la superficie de un soporte sólido cuando se usa el kit. El medio generador de señal puede estar asociado previamente con un anticuerpo de la invención o puede requerir combinación con uno o más componentes, por ejemplo, tampones, conjugados de enzima-anticuerpo, sustratos de enzima o similares, antes de su uso. Los kits también pueden incluir reactivos adicionales, por ejemplo, reactivos de bloqueo para reducir la unión no específica a la superficie de fase sólida, reactivos de lavado, sustratos de enzima y similares. La superficie de fase sólida puede estar en forma de placas de microtitulación, microesferas u otros materiales adecuados para inmovilizar proteínas, péptidos o polipéptidos. Preferentemente una enzima que cataliza la formación de un producto quimioluminiscente o cromogénico o la reducción de un sustrato quimioluminiscente o cromogénico es un componente del medio generador de señal. Tales enzimas se conocen bien en la técnica.

Tales kits son útiles en la detección, control y diagnóstico de afecciones caracterizadas por sobreexpresión o expresión inapropiada de péptidos, polipéptidos, anticuerpos y/o polinucleótidos relacionados con tumor maligno hematológico, así como hibridomas, células huésped y vectores que comprenden una o más de tales composiciones como se desvelan en el presente documento.

También pueden prepararse kits terapéuticos y de diagnóstico de la presente invención que comprenden al menos uno del anticuerpo, péptido, fragmento de unión a antígeno, hibridoma, vector, vacuna, polinucleótido o composiciones celulares desveladas en el presente documento e instrucciones para usar la composición como un reactivo de diagnóstico o agente terapéutico. Los recipientes para su uso en tales kits pueden comprender típicamente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro recipiente adecuado, en el que puede colocarse una o más de las composiciones de diagnóstico y/o terapéuticas y preferentemente separarse de forma adecuada en alícuotas. Cuando se proporciona también un segundo agente terapéutico, el kit también puede contener un segundo recipiente distinto en el que puede colocarse la segunda composición de diagnóstico y/o terapéutica. Como alternativa, puede prepararse una pluralidad de compuestos en una composición farmacéutica sencilla y pueden envasarse en un medio de recipiente sencillo tal como un vial, matraz, jeringa, frasco u otro recipiente sencillo adecuado. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el vial o viales en confinamiento estrecho para venta comercial, tal como, por ejemplo, recipientes de plástico moldeados por soplado o inyección en los que se conserva el vial o viales deseados. Cuando se incluye un radiomarcador, marcador cromogénico, fluorogénico u otro tipo de marcador detectable o medio de detección dentro del kit, el agente marcador puede proporcionarse en el mismo recipiente que la composición de diagnóstico o terapéutica en sí misma o puede como alternativa colocarse en un segundo medio de recipiente distinto en el que esta segunda composición puede colocarse y separarse en alícuotas de forma adecuada. Como alternativa, el reactivo de detección y el marcador pueden prepararse en un medio recipiente sencillo y, en la mayoría de los casos, el kit también incluirá típicamente un medio para contener el vial o viales en confinamiento estrecho para venta comercial y/o envasado y suministro conveniente.

#### 4.9 Composiciones polinucleotídicas

Como se usa en el presente documento, las expresiones "segmento de ADN" y "polinucleótido" se refieren a una molécula de ADN que se ha aislado del ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de

ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contiene una o más secuencias codificantes pero que está sustancialmente aislado de, o purificado de, ADN genómico total de la especie de la que se obtiene el segmento de ADN. Se incluyen dentro de las expresiones "segmento de ADN" y "polinucleótido" segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de tales segmentos y también vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmicos, fagémidos, fagos, virus y similares.

Como se entenderá por los expertos en la materia, los segmentos de ADN de la presente invención pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas por plásmidos y segmentos génicos obtenidos por ingeniería genética más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, péptidos y similares. Tales segmentos pueden estar naturalmente aislados o modificarse sintéticamente por la mano del hombre.

"Aislado", como se usa en el presente documento, significa que un polinucleótido está sustancialmente separado de otras secuencias codificantes y que el segmento de ADN no contiene grandes partes de ADN codificante no relacionado, tal como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes o regiones codificantes de polipéptidos funcionales. Por supuesto, esto se refiere al segmento de ADN como se aisló originalmente y no excluye genes o regiones codificantes añadidas posteriormente al segmento por la mano del hombre.

Como se reconocerá por el experto en la materia, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNHn, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de uno a uno y moléculas de ARNm que no contiene intrones. Pueden estar presentes, pero no es necesario, secuencias adicionales codificantes o no codificantes dentro de un polinucleótido de la presente invención y un polinucleótido puede, pero no necesita, estar ligado a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico o una parte de la misma) o puede comprender una variante o un equivalente funcional biológico o antigénico de dicha secuencia. Las variantes polinucleotídicas pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, como se describe adicionalmente posteriormente, preferentemente de modo que la inmunogenicidad del polipéptido codificado no disminuya, en relación con una proteína tumoral nativa. El efecto en la inmunogenicidad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en el presente documento. El término "variantes" también abarca genes homólogos de origen xenogénico.

Cuando se comparan secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, se dice que dos secuencias son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para correspondencia máxima, como se describe posteriormente. Las comparaciones entre dos secuencias típicamente se realizan comparando las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75, de 40 a aproximadamente 50, en las que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen óptimamente.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse usando el programa Megalign en el conjunto de software bioinformático Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, pág. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pág. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D. G. y Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E. W. y Muller W. (1988) CABIOS 4: 11-17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W. J. y Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80: 726-730.

Como alternativa, puede realizarse alineamiento óptimo de secuencias para comparación por el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) Add. APL. Math 2: 482, por el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, por la búsqueda de procedimientos similares de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, por implantaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección.

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y col. (1977) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402 y Altschul y col. (1990) J Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente. Pueden usarse BLAST y BLAST 2.0, por ejemplo con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. El software para realizar análisis de

BLAST está disponible públicamente a través del centro nacional para la información biotecnológica. En un ejemplo ilustrativo, pueden calcularse puntuaciones acumulativas usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre <0). Para secuencias de aminoácidos, puede usarse una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa cae en la cantidad X de su valor máximo adquirido; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11 y expectativa (E) de 10 y alineamientos de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.

Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la parte de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos, habitualmente de 5 a 15 por ciento, o de 10 a 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en el que las bases de ácido nucleico idénticas o resto aminoacídico aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Por lo tanto, la presente invención abarca secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas que tienen identidad sustancial con las secuencias desveladas en el presente documento, por ejemplo las que comprenden al menos 50 % de identidad de secuencia, preferentemente al menos 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o mayor, identidad de secuencia en comparación con una secuencia polinucleotídica o polipeptídica de la presente invención usando los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, análisis de BLAST usando parámetros convencionales, como se describe posteriormente). Un experto en la materia reconocerá que estos valores pueden ajustarse de forma apropiada para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración codónica, similitud de aminoácidos, posicionamiento de fase de lectura y similares.

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona polinucleótidos y polipéptidos aislados que comprenden diversas longitudes de tramos contiguos de secuencia idéntica o complementaria a una o más de las secuencias desveladas en el presente documento. Por ejemplo, se proporcionan polinucleótidos por la presente invención que comprenden al menos aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 ó 1000 o más nucleótidos contiguos de una o más de las secuencias desveladas en el presente documento así como todas las longitudes intermedias entre ellas. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias", en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores citados, tales como 16, 17, 18, 19, *etc.*; 21, 22, 23, *etc.*; 30, 31, 32, *etc.*; 50, 51, 52, 53, *etc.*; 100, 101, 102, 103, *etc.*; 150, 151, 152, 153, *etc.*; incluyendo todos los números enteros de 200-500; 500-1.000, y similares.

Los polinucleótidos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí misma, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes y similares, de modo que su longitud global pueda variar considerablemente. Se contempla por lo tanto que puede emplearse un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando limitada preferentemente la longitud total por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido. Por ejemplo, se contempla que son útiles segmentos de ADN ilustrativos con longitudes totales de aproximadamente 10.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 1.000, aproximadamente 500, aproximadamente 200, aproximadamente 100, aproximadamente 50 pares de bases de longitud y similares (incluyendo todas las longitudes intermedias) en muchas implementaciones de la presente invención.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a polinucleótidos que son capaces de hibridar en condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia polinucleotídica proporcionada en el presente documento, o un fragmento de la misma, o una secuencia complementaria de la misma. Se conocen bien técnicas de hibridación en la materia de biología molecular. Para fines de ilustración, las condiciones moderadamente rigurosas adecuadas para ensayar la hibridación de un polinucleótido de la presente invención con otros polinucleótidos incluyen prelavado en una solución de SSC 5X, SDS 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50 °C-65 °C, SSC 5 X, durante una noche; seguido de lavado dos veces a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2 X, 0,5 X y 0,2 X que contienen SDS 0,1 %.

Además, se apreciará por los expertos en la materia que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento.

Algunos de estos polinucleótidos portan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, se contemplan específicamente polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso codónico por la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y proteínas resultantes pueden, pero no necesitan, tener una estructura o función alterada. Los alelos pueden identificarse usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencia de base de datos).

#### 4.10 Sondas y cebadores

En otras realizaciones de la presente invención las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento pueden usarse provechosamente como sondas o cebadores para hibridación de ácidos nucleicos. Como tales, se contempla que los segmentos de ácido nucleico que comprenden una región de secuencia de secuencia contigua de al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 nucleótidos de longitud que tiene la misma secuencia que, o es complementaria a, al menos una secuencia contigua de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o 95 nucleótidos de longitud de los polinucleótidos desvelados tendrán utilidad particular en una diversidad de realizaciones de hibridación. También serán útiles secuencias complementarias o idénticas contiguas más largas, por ejemplo, las de aproximadamente 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 525, 550, 575, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o incluso 1000 nucleótidos aproximadamente (incluyendo todas las longitudes intermedias) y todas las secuencias de longitud completa como los polinucleótidos desvelados en ciertas realizaciones como sondas, cebadores o dianas de amplificación y similares.

La capacidad de dichas sondas de ácido nucleico para hibridar específicamente con una secuencia de interés les permitirá ser útiles en la detección de la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. Sin embargo, también se contemplan otros usos, tales como el uso de la información de secuencia para la preparación de cebadores de especie mutante, o cebadores, para su uso en la preparación de otras construcciones genéticas y para identificar y caracterizar polinucleótidos de longitud completa y ARNm, ADNc de longitud completa o sustancialmente completa y similares.

Se contemplan particularmente moléculas polinucleotídicas que tienen regiones de secuencia que consisten en tramos de nucleótidos contiguos idénticos o complementarios a una o más secuencias polinucleotídicas como se desvela en el presente documento, como sondas de hibridación para su uso en, por ejemplo, análisis de hibridación de Southern y transferencia de Northern. Esto permitiría que se analizara un producto génico, o fragmento del mismo, tanto en diversos tipos celulares como también en diversas células bacterianas. El tamaño total del fragmento, así como el tamaño del tramo o tramos complementarios, dependerá en última instancia del uso pretendido o aplicación del segmento de ácido nucleico particular. Fragmentos más pequeños encontrarán generalmente uso en realizaciones de hibridación, en las que la longitud de la región complementaria contigua puede variarse, tal como entre aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y hasta e incluyendo secuencias complementarias contiguas mayores, incluyendo las de aproximadamente 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, ó 200 nucleótidos de longitud también pueden usarse de acuerdo con el objetivo deseado dado y la longitud particular de las secuencias complementarias que se desean detectar por análisis de hibridación.

El uso de una sonda de hibridación de aproximadamente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 500 nucleótidos de longitud permite la formación de una molécula doble que es tanto estable como selectiva. Se prefieren generalmente moléculas que tengan secuencias complementarias contiguas sobre tramos mayores de aproximadamente 20 bases de longitud, no obstante, para aumentar la estabilidad y selectividad del híbrido, y por lo tanto mejorar la calidad y grado de moléculas híbridas específicas obtenidas. Se preferirá generalmente diseñar moléculas de ácido nucleico que tengan tramos complementarios de genes de entre aproximadamente 25 y 300 nucleótidos contiguos o incluso más largos cuando se desee.

Pueden seleccionarse sondas de hibridación de cualquier parte de cualquiera de las secuencias desveladas en el presente documento. Todo lo que se requiere es revisar las secuencias desveladas, o para cualquier parte contigua de una secuencia tal, de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos de longitud hasta e incluyendo la secuencia de longitud completa, que se desea utilizar como una sonda o cebador. La selección de secuencias de sonda y cebador puede gobernarse por diversos factores. Por ejemplo, se puede desear emplear cebadores hacia los extremos terminales de la secuencia total.

Pueden prepararse fácilmente segmentos o fragmentos polinucleotídicos pequeños por, por ejemplo, síntesis directa del fragmento por medios químicos, como se realiza habitualmente usando un sintetizador oligonucleotídico automático. Además, pueden obtenerse fragmentos por aplicación de tecnología de reproducción de ácidos nucleicos, tal como la tecnología de PCR™ de la Patente de Estados Unidos 4.683.202 (incorporada en el presente documento por referencia), introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante y por otras técnicas de ADN recombinante generalmente conocidas por los expertos en la materia de la biología molecular.

Las secuencias de nucleótidos de la invención pueden usarse por su capacidad para formar selectivamente moléculas dobles con tramos complementarios del gen completo o fragmentos génicos de interés. Dependiendo de la aplicación prevista, se deseará típicamente emplear diversas condiciones de hibridación para conseguir diversos grados de selectividad de la sonda hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren alta selectividad, se deseará típicamente emplear condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos, por ejemplo, se seleccionarán condiciones de sal relativamente baja y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por una concentración salina de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M de sal a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Tales condiciones selectivas toleran pocos, o ninguno, emparejamientos erróneos entre la sonda y el molde o hebra diana y serían particularmente adecuadas para aislar secuencias relacionadas.

Por supuesto, para algunas aplicaciones, por ejemplo, cuando se desea preparar mutantes empleando una cadena de cebador mutante hibridada con un molde subyacente, se necesitarán típicamente condiciones de hibridación menos rigurosas (rigurosidad reducida) para permitir la formación del heterodúplex. En estas circunstancias puede desearse emplear condiciones salinas tales como las de sal de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M, temperaturas que varían de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C. De este modo pueden identificarse fácilmente especies de hibridación cruzada como señales de hibridación positiva con respecto a hibridaciones de control. En cualquier caso, se aprecia generalmente que las condiciones pueden hacerse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida, que sirve para desestabilizar el dúplex híbrido de la misma manera que la temperatura elevada. Por lo tanto, las condiciones de hibridación pueden manipularse fácilmente y por lo tanto serán generalmente un procedimiento de selección dependiendo de los resultados deseados.

#### 4.11 Identificación y caracterización de polinucleótidos

Los polinucleótidos pueden identificarse, prepararse y/o manipularse usando cualquiera de una diversidad de técnicas bien establecidas. Por ejemplo, un polinucleótido puede identificarse, como se describe en más detalle posteriormente, explorando una microserie de ADNc con respecto a expresión asociada con tumor (es decir, expresión que es al menos dos veces mayor en un tumor que en tejido normal, según se determina usando un ensayo representativo proporcionado en el presente documento). Dichas exploraciones pueden realizarse, por ejemplo, usando una microserie Synteni (Palo Alto, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (y esencialmente como se describe en Schena y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10614-10619, 1996 y Heller y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2150-2155, 1997). Como alternativa, pueden amplificarse polinucleótidos a partir de ADNc preparado de células que expresan las proteínas descritas en el presente documento, tales como células tumorales relacionadas con tumor maligno hematológico. Tales polinucleótidos pueden amplificarse mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para este enfoque, pueden diseñarse cebadores específicos de secuencia basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento y pueden comprarse o sintetizarse.

Puede usarse una parte amplificada de un polinucleótido de la presente invención para aislar un gen de longitud completa de una biblioteca adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc tumoral relacionado con tumor maligno hematológico) usando técnicas bien conocidas. Dentro de tales técnicas, se explora una biblioteca (ADNc o genómica) usando una o más sondas o cebadores polinucleotídicos adecuados para amplificación. Preferentemente, se selecciona por tamaño una biblioteca que incluye moléculas mayores. También pueden preferirse bibliotecas con cebadores aleatorios para identificar regiones 5' y cadena arriba de genes. Se prefieren bibliotecas genómicas para obtener intrones y extender secuencias 5'.

Para técnicas de hibridación, una secuencia parcial puede marcarse (por ejemplo, por traslación por muescas o marcando en el extremo con <sup>32</sup>P) usando técnicas bien conocidas. Se explora después generalmente una biblioteca bacteriana o de bacteriófagos por filtros de hibridación que contienen colonias bacterianas desnaturalizadas (o cultivos que contienen placas de fagos) con la sonda marcada (véase Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Las placas o colonias que hibridan se seleccionan y expanden y el ADN se aísla para análisis posterior. Pueden analizarse clones de ADNc para determinar la cantidad de secuencia adicional por, por ejemplo, PCR usando un cebador de la secuencia parcial y un cebador del vector. Pueden generarse mapas de restricción y secuencias parciales para identificar uno o más clones solapantes. La secuencia completa puede determinarse después usando técnicas convencionales, que pueden implicar generar una serie de clones de delección. Las secuencias solapantes resultantes pueden después ensamblarse en una secuencia contigua sencilla. Puede generarse una molécula de ADNc de longitud completa ligando fragmentos adecuados, usando técnicas bien conocidas.

Como alternativa, existen numerosas técnicas de amplificación para obtener una secuencia codificante de longitud de completa de una secuencia de ADNc parcial. Dentro de tales técnicas, la amplificación se realiza generalmente mediante PCR. Puede usarse cualquiera de una diversidad de kits disponibles en el mercado para realizar la etapa de amplificación. Pueden diseñarse cebadores usando, por ejemplo, software o algoritmos o fórmulas bien conocidas en la técnica.

Una técnica de amplificación tal es PCR inversa (véase Triglia y col., Nucl. Acids Res. 16: 8186, 1988), que usa enzimas de restricción para generar un fragmento en la región conocida del gen. El fragmento se circulariza después

por ligación intramolecular y se usa como un molde para PCR con cebadores divergentes derivados de la región conocida. Dentro de un enfoque alternativo, pueden recuperarse secuencias adyacentes a una secuencia parcial por amplificación con un cebador a una secuencia de engarce y un cebador específico para una región conocida. Las secuencias amplificadas se someten típicamente a un segundo ciclo de amplificación con el mismo cebador de engarce y un segundo cebador específico para la región conocida. Una variación en este procedimiento, que emplea dos cebadores que inician la extensión en direcciones opuestas de la secuencia conocida, se describe en el documento WO 96/38591. Otra técnica tal se conoce como "amplificación rápida de extremos de ADNc" o RACE. Esta técnica implica el uso de un cebador interno y un cebador externo, que hibrida con una región poliA o secuencia vector, para identificar secuencias que están 5' y 3' de una secuencia conocida. Las técnicas adicionales incluyen PCR de captura (Lagerstrom y col., PCR Methods Applic. 1: 111-19,1991) y walking PCR (Parker y col., Nucl. Acids. Res. 19: 3055-60, 1991). También pueden emplearse otros procedimientos que emplean amplificación para obtener una secuencia de ADNc de longitud completa.

En ciertos casos, es posible obtener una secuencia de ADNc de longitud completa por análisis de secuencias proporcionadas en una base de datos de marcador de secuencia expresada (EST), tal como la disponible de GenBank. Pueden realizarse generalmente búsquedas para EST solapantes usando programas bien conocidos (por ejemplo, búsquedas de NCBI BLAST) y tales EST pueden usarse para generar una secuencia de longitud completa contigua. También pueden obtenerse secuencias de ADN de longitud completa por análisis de fragmentos genómicos.

#### 4.12 Expresión de polinucleótidos en células huésped

En otras realizaciones de la invención, pueden usarse secuencias polinucleotídicas o fragmentos de las mismas que codifican polipéptidos de la invención, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de las mismas, en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido en células huésped apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, pueden producirse otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos o una funcionalmente equivalente y estas secuencias pueden usarse para clonar y expresar un polipéptido dado.

Como se entenderá por los expertos en la materia, puede ser ventajoso en algunos casos producir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que poseen codones de origen no natural. Por ejemplo, pueden seleccionarse codones preferidos por un huésped procarionta o eucariota particular para aumentar la tasa de expresión proteica o para producir un transcrito de ARN recombinante que tenga propiedades deseables, tales como una semivida que es más larga que la de un transcrito generado a partir de la secuencia de origen natural.

Además, las secuencias polinucleotídicas de la presente invención pueden obtenerse por ingeniería genética usando procedimientos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias codificantes de polipéptidos por una diversidad de razones, incluyendo pero sin limitación, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento y/o expresión del producto génico. Por ejemplo, puede usarse barajado de ADN por fragmentación aleatoria y reensamblaje por PCR de fragmentos génicos y oligonucleótidos sintéticos para obtener por ingeniería genética las secuencias de nucleótidos. Además, puede usarse mutagénesis dirigida para insertar nuevos sitios de restricción, alterar patrones de glucosilación, cambiar la preferencia codónica, producir variantes de corte y empalme o introducir mutaciones y así sucesivamente.

En otra realización de la invención, pueden ligarse secuencias de ácido nucleico naturales, modificadas o recombinantes a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, puede ser útil explorar bibliotecas peptídicas con respecto a inhibidores de actividad polipeptídica para codificar una proteína quimérica que pueda reconocerse por un anticuerpo disponible en el mercado. También puede obtenerse por ingeniería genética una proteína de fusión para que contenga un sitio de escisión localizado entre la secuencia codificante de polipéptido y la secuencia proteica heteróloga, de modo que el polipéptido pueda escindirse y purificarse separado del resto heterólogo.

Pueden sintetizarse secuencias que codifican un polipéptido deseado, completo o en parte, usando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers, M. H. y col. (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223, Horn, T. y col. (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232). Como alternativa, la proteína en sí misma puede producirse usando procedimientos químicos para sintetizar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o una parte de la misma. Por ejemplo, puede realizarse síntesis peptídica usando diversas técnicas de fase sólida (Roberge, J. Y. y col. (1995) Science 269: 202-204) y puede conseguirse síntesis automática, por ejemplo, usando el Sintetizador Peptídico ABI 431A (Perkin Elmer, Palo Alto, CA).

Puede purificarse sustancialmente un péptido de nueva síntesis por cromatografía líquida de alto rendimiento preparatoria (por ejemplo, Creighton, T. (1983) Proteins, Structures and Molecular Principles, WH Freeman and Co., Nueva York, N. Y.) u otras técnicas comparables disponibles en la materia. La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman). Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, o cualquier parte del mismo, puede alterarse durante síntesis directa y/o combinarse usando procedimientos químicos con secuencias de otras proteínas, o cualquier parte de las mismas, para producir un polipéptido variante.



- Para expresar un polipéptido deseado, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, o equivalentes funcionales, pueden insertarse en vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Pueden usarse procedimientos que se conocen bien por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contengan secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control traduccional y transcripcional apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas se describen en Sambrook, J. y col. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., y Ausubel, F. M. y col. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y.
- Puede utilizarse una diversidad de sistemas de huésped/vector de expresión para contener y expresar secuencias polinucleotídicas. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN plasmídicos o de cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levaduras; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacteriana (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.
- Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son las regiones no traducidas del vector, potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3', que interactúan con proteínas celulares del huésped para llevar a cabo transcripción y traducción. Tales elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizado, puede usarse cualquiera variedad de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como el promotor de lacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o plásmido PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) y similares. En sistemas celulares de mamífero, se prefieren generalmente a promotores de genes de mamífero o de virus de mamífero. Si es necesario generar una línea celular que contiene múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, pueden usarse provechosamente vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.
- En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades, por ejemplo para la inducción de anticuerpos, pueden usarse vectores que dirigen expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero sin limitación, los vectores de clonación y expresión de *E. coli* multifuncionales tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en los que la secuencia que codifica el polipéptido de interés puede estar ligada al vector en fase con secuencias para la Met amino terminal y los 7 restos posteriores de beta galactosidasa de modo que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke, G. y S. M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 5503-5509); y similares. También pueden usarse vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) para expresar polipéptidos ajenos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción en perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Las proteínas realizadas en tales sistemas pueden diseñarse para incluir heparina, trombina o sitios de escisión de proteasa factor XA de modo que el polipéptido clonado de interés pueda liberarse del resto de GST a voluntad.
- En la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH. Para revisiones, véase Ausubel y col. (mencionado anteriormente) y Grant y col. (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544.
- En los casos en los que se usan vectores de expresión vegetales, la expresión de secuencias que codifican polipéptidos puede dirigirse por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6: 307-311. Como alternativa, pueden usarse promotores vegetales tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi, G. y col. (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680; Broglie, R. y col. (1984) *Science* 224: 838-843; y Winter, J. y col. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17: 85-105). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales por transformación de ADN directa o transfección mediada por patógeno. Tales técnicas se describen en varias revisiones disponibles de forma general (véase, por ejemplo, Hobbs, S. o Murry, L. E. en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, Nueva York, N. Y.; pág. 191-196).
- También puede usarse un sistema de insectos para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en un sistema tal, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes ajenos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y colocarse bajo el control del promotor de polihedrina. La inserción exitosa de la secuencia codificante de polipéptido hará al gen de polihedrina inactivo y producirá virus recombinante sin proteína de cubierta. Los virus recombinantes pueden después usarse para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que el polipéptido de interés puede expresarse (Engelhard, E. K. y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3224-3227).

En células de huésped mamífero, están generalmente disponibles varios sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, en casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, pueden ligarse secuencias que codifican un polipéptido de interés en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral puede usarse para obtener un virus viable que es capaz de expresar el polipéptido en células huésped infectadas (Logan, J. y Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 3655-3659). Además, pueden usarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

También pueden usarse señales de inicio específicas para conseguir una traducción más eficaz de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Tales señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. En casos en los que se insertan secuencias que codifican el polipéptido, su codón de inicio y secuencias cadena arriba en el vector de expresión apropiado, pueden no necesitarse señales de control transcripcional o traduccional adicionales. Sin embargo, en casos en los que solamente se inserta la secuencia codificante, o una parte de la misma, deberían proporcionarse señales de control traduccional exógenas incluyendo el codón de inicio ATG. Además, el codón de inicio debería estar en la fase de lectura correcta para asegurar la traducción del inserto completo. Los elementos traduccionales exógenos y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse por la inclusión de potenciadores que son apropiados para el sistema celular particular que se usa, tales como los descritos en la bibliografía (Scharf, D. y col. (1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 125-162).

Además, puede seleccionarse una cepa de célula huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitación, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccional que escinde una forma "prepro" de la proteína también puede usarse para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correctos. Pueden seleccionarse diferentes células huésped tales como CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y WI38, que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraducionales, para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína ajena.

Para producción a largo plazo, el alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere generalmente expresión estable. Por ejemplo, pueden transformarse líneas celulares que expresan de forma estable un polinucleótido de interés usando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógena y un gen marcador seleccionable en el mismo o en un vector separado. Tras la introducción del vector, se puede permitir a las células crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan de forma exitosa las secuencias introducidas. Pueden hacerse proliferar clones resistentes de células transformadas de forma estable usando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo celular.

Puede usarse cualquier número de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero sin limitación, los genes de timidina quinasa de virus de herpes simple (Wigler, M. y col. (1977) Cell 11: 223-32) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, I. y col. (1990) Cell 22: 817-23) que pueden emplearse en células tk.sup. o aprt.sup., respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como la base para la selección; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, M. y col. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin, F. y col (1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14); y als o pat, que confiere resistencia a clorsulfurón y fosfinotricin acetiltransferasa, respectivamente (Murry, mencionado anteriormente). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman, S. C. y R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-51). Recientemente, el uso de marcadores visibles ha ganado popularidad usándose ampliamente tales marcadores como antocianinas, beta-glucuronidasa y su sustrato GUS y luciferasa y su sustrato luciferina, no solamente para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión proteica transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes, C. A. y col. (1995) Methods Mol. Biol. 55: 121-131).

Aunque la presencia/ausencia de la expresión del gen marcador sugiere que el gen de interés también está presente, su presencia y expresión puede requerir confirmarse. Por ejemplo, si la secuencia que codifica un polipéptido se inserta dentro de una secuencia de gen marcador, pueden identificarse células recombinantes que contienen secuencias por la ausencia de función del gen marcador. Como alternativa, puede colocarse un gen marcador en tándem con una secuencia codificante de polipéptidos bajo el control de un promotor sencillo. La expresión del gen marcador en respuesta a inducción o selección habitualmente indica expresión del gen en tándem también.

Como alternativa, pueden identificarse células huésped que contienen y expresan una secuencia polinucleotídica deseada por una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, hibridaciones de ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de inmunoensayo o bioensayo de proteínas que incluyen tecnologías basadas en membrana, solución o microplaca para la detección y/o

cuantificación de ácido nucleico o proteína.

Se conoce en la técnica una diversidad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto. Los ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Puede preferirse un inmunoensayo basado en monoclonal de dos sitios utilizando anticuerpos monoclonales reactivos para dos epítomos no de interferencia en un polipéptido dado para algunas aplicaciones, pero también puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros sitios, en Hampton, R. y col. (1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, Minn.) y Maddox, D. E. y col. (1983; J. Exp. Med. 158: 1211-1216).

Se conoce una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación por los expertos en la materia y pueden usarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada o sondas de PCR para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos incluyen oligomarcaje, translación por huecos, marcaje de extremos o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Como alternativa, las secuencias, o cualquier parte de las mismas, pueden clonarse en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están disponibles en el mercado y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN *in vitro* por adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos pueden realizarse usando una diversidad de kits disponibles en el mercado. Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados, que pueden usarse incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partícula magnéticas y similares.

Pueden cultivarse células huésped transformadas con una secuencia polinucleotídica de interés en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede secretarse o contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Como se entenderá por los expertos en la materia, los vectores de expresión que contienen polinucleótidos de la invención pueden diseñarse para contener secuencias señal que dirigen la secreción del polipéptido codificado a través de una membrana de célula procarionota o eucariota. Otras construcciones recombinantes pueden usarse para unir secuencias que codifican un polipéptido de interés a una secuencia nucleotídica que codifica un dominio polipeptídico que facilitará la purificación de proteínas solubles. Tales dominios facilitadores de purificación incluyen, pero sin limitación, péptidos quelantes de metal tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad de FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). La inclusión de secuencias de engarce escindibles tales como las específicas para Factor XA o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, Calif.) entre el dominio de purificación y el polipéptido codificado pueden usarse para facilitar la purificación. Un vector de expresión tal posibilita la expresión de una proteína de fusión que contiene un polipéptido de interés y un ácido nucleico que codifica 6 restos de histidina que preceden un sitio de escisión de enteroquinasa o una tiorredoxina. En los restos de histidina facilitan la purificación en IMIAC (cromatografía de afinidad iónica de metal inmovilizado) como se describe en Porath, J. y col. (1992, Prot. Exp. Purif. 3: 263-281) mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para purificar el polipéptido deseado de la proteína de fusión. Se proporciona un análisis de vectores que contienen proteínas de fusión en Kroll, D. J. y col. (1993; DNA Cell Biol. 12: 441-453).

Además de los procedimientos de producción recombinantes, los polipéptidos de la invención, y fragmentos de los mismos, pueden producirse por síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (Merrifield J. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154). Puede realizarse síntesis proteica usando técnicas manuales o por automatización. Puede conseguirse síntesis automática, por ejemplo, usando Applied Biosystems 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer). Como alternativa, pueden sintetizarse químicamente diversos fragmentos de forma separada y combinarse usando procedimientos químicos para producir la molécula de longitud completa.

#### 4.13 Mutagénesis específica de sitio

La mutagénesis específica de sitio es una técnica útil en la preparación de péptidos individuales, o polipéptidos biológicamente funcionales equivalentes, a través de mutagénesis específica de los polinucleótidos subyacentes que los codifican. La técnica, bien conocida por los expertos en la materia, proporciona adicionalmente una capacidad fácil para preparar y ensayar variantes de secuencia, por ejemplo, incorporando una o más de las anteriores consideraciones, introduciendo uno o más cambios de secuencia de nucleótidos en el ADN. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias oligonucleotídicas específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebadores de suficiente tamaño y complejidad de secuencia para formar una doble cadena estable en ambos lados del punto de unión de delección que se atraviesa. Pueden emplearse mutaciones en una secuencia polinucleotídica seleccionada para mejorar, alterar, reducir, modificar o cambiar de otro modo las propiedades del polinucleótido en sí mismo y/o alterar las propiedades, actividad, composición, estabilidad o secuencia primaria del polipéptido codificado.

En ciertas realizaciones de la presente invención, los inventores contemplan la mutagénesis de las secuencias

polinucleotídicas desveladas para alterar una o más propiedades del polipéptido codificado, tal como la antigenicidad de una vacuna polipeptídica. Las técnicas de mutagénesis específica de sitio se conocen bien en la materia y se usan ampliamente para crear variantes tanto de polipéptidos como de polinucleótidos. Por ejemplo, se usa con frecuencia mutagénesis específica de sitio para alterar una parte específica de una molécula de ADN. En tales realizaciones, se emplea un cebador que comprende típicamente de aproximadamente 14 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, alterándose de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 restos en ambos lados del punto de unión de la secuencia.

Como se apreciará por los expertos en la materia, las técnicas de mutagénesis específicas de sitio han empleado con frecuencia un vector de fago que existe en una forma tanto monocatenaria como bicatenaria. Los vectores típicos útiles en mutagénesis dirigida incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles en el mercado y su uso se conoce bien generalmente por los expertos en la materia. Los plásmidos bicatenarios también se emplean habitualmente en mutagénesis dirigida que elimina la etapa de transferir el gen de interés de un plásmido a un fago.

En general, la mutagénesis dirigida de acuerdo con el presente documento se realiza obteniendo primero un vector monocatenario o separando por fusión dos cadenas de un vector bicatenario que incluye dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Se prepara un cebador oligonucleotídico que porta la secuencia mutada deseada, generalmente de forma sintética. Este cebador se hibrida después con el vector monocatenario y se somete a enzimas de polimerización de ADN tales como el fragmento Klenow de polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la cadena que porta la mutación. Por lo tanto, se forma un heterodúplex en el que una hebra codifica su secuencia no mutada original y la segunda hebra porta la mutación deseada. Este vector de heterodúplex se usa después para transformar células apropiadas, tales como células de *E. coli* y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que portan la disposición de secuencia mutada.

La preparación de variantes de secuencia de los segmentos de ADN que codifican el péptido seleccionado usando mutagénesis dirigida proporciona un medio para producir especies potencialmente útiles y no se pretende que sea limitante puesto que existen otras formas en las que se pueden obtener variantes de secuencia de péptidos y las secuencias de ADN que los codifican. Por ejemplo, pueden tratarse vectores recombinantes que codifican la secuencia peptídica deseada con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener variantes de secuencia. Se encuentran detalles específicos con respecto a estos procedimientos y protocolos en las enseñanzas de Maloy y col., 1994; Segal, 1976; Prokop y Bajpai, 1991; Kuby, 1994; y Maniatis y col., 1982, cada una incorporada en el presente documento por referencia, para ese fin.

Como se usa en el presente documento, la expresión "procedimiento de mutagénesis dirigida a oligonucleótidos" se refiere a procedimientos dependientes de molde y propagación mediada por vector que da como resultado un aumento de la concentración de una molécula de ácido nucleico específica en relación con su concentración inicial o un aumento de la concentración de una señal detectable tal como amplificación. Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "procedimiento de mutagénesis dirigida a oligonucleótidos" se refiera a un procedimiento que implica la extensión dependiente de molde de una molécula de cebador. La expresión procedimiento dependiente de molde se refiere a síntesis de ácido nucleico de una molécula de ARN o ADN en la que la secuencia de la hebra de nueva síntesis de ácido nucleico se dicta por las reglas bien conocidas de formación de pares de bases complementarias (véase, por ejemplo, Watson, 1987). Típicamente, las metodologías mediadas por vector implican la introducción del fragmento de ácido nucleico en un vector de ADN o ARN, la amplificación clonal del vector y la recuperación del fragmento de ácido nucleico amplificado. Los ejemplos de tales metodologías se proporcionan por la Patente de Estados Unidos N° 4.237.224, incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad.

#### 4.14 Técnicas de amplificación de polinucleótidos

Están disponibles varios procedimientos dependientes de molde para amplificar las secuencias diana de interés presentes en una muestra. Uno de los procedimientos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR™) que se describe en detalle en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Brevemente, en PCR™, se preparan dos secuencias cebadoras que son complementarias a regiones en cadenas complementarias opuestas de la secuencia diana. Se añade un exceso de desoxinucleósido trifosfatos a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa (por ejemplo, *Taq* polimerasa). Si la secuencia diana está presente en una muestra, los cebadores se unirán a la diana y la polimerasa hará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia diana añadiendo nucleótidos. Elevando y reduciendo la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán de la diana para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán a la diana y al producto de reacción y el procedimiento se repite. Preferentemente pueden realizarse procedimientos de transcripción inversa y amplificación por PCR™ para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado. Las metodologías de reacción en cadena de la polimerasa se conocen bien en la técnica.

Otro procedimiento para amplificación es la reacción en cadena de la ligasa (denominada LCR), desvelada en la Publicación de Solicitud de Patente Europea N° 320.308 (incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad). En LCR, se preparan dos pares de sondas complementarias y, en presencia de la

secuencia diana, cada par se unirá a cadenas complementarias opuestas de la diana de modo que se ensamblan. En presencia de una ligasa, los dos pares de sondas se ligarán para formar una unidad sencilla. Por ciclación de temperatura, como en PCR™, las unidades ligadas unidas se disocian de la diana y después actúan como “secuencias diana” para ligación de pares de sondas en exceso. La Patente de Estados Unidos N° 4.883.750, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad, describe un procedimiento alternativo de amplificación similar, a LCR para unir pares de sonda a una secuencia diana.

También puede usarse Qbeta Replicasa, descrita en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional de PCT N° PCT/US87/00880, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad, como otro procedimiento de amplificación más en la presente invención. En este procedimiento, una secuencia replicativa de ARN que tiene una región complementaria a la de una diana se añade a una muestra en presencia de una ARN polimerasa. La polimerasa copiará la secuencia replicativa que puede después detectarse.

Un procedimiento de amplificación isotérmica, en el que se usan endonucleasas de restricción y ligasas para conseguir la amplificación de moléculas diana que contienen nucleótido 5'-[ $\alpha$ -tio]trifosfatos en una hebra de un sitio de restricción (Walker y col., 1992, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad) también puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención.

La Amplificación por Desplazamiento de Cadena (SDA) es otro procedimiento para llevar a cabo amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica múltiples ciclos de desplazamiento de cadena y síntesis, es decir traslación por huecos. Un procedimiento similar, denominado Reacción en Cadena de Reparación (RCR) es otro procedimiento de amplificación que puede ser útil en la presente invención e implica hibridar varias sondas a lo largo de una región diana para amplificación, seguido de una reacción de reparación en la que sólo están presentes dos de las cuatro bases. Las otras dos bases pueden añadirse como derivados biotinilados para detección fácil. Se usa un enfoque similar en SDA.

También pueden detectarse secuencias usando una reacción de sonda cíclica (CPR). En CPR, se hibrida una sonda que tiene una secuencia 3' y 5' de ADN no diana y una secuencia interna o “media” de ARN específico de la proteína diana con ADN que está presente en una muestra. Tras la hibridación, la reacción se trata con RNasaH y los productos de la sonda se identifican como productos distintivos generando una señal que se libera después de la digestión. El molde original se hibrida con otra sonda cíclica y la reacción se repite. De este modo, CPR implica amplificar una señal generada por hibridación de una sonda con un ácido nucleico expresado específico del gen diana.

Otros procedimientos de amplificación más descritos en la Solicitud de Patente de Gran Bretaña N° 2 202 328 y en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT N° PCT/US89/01025, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, pueden usarse de acuerdo con la presente invención. En la aplicación anterior, los cebadores “modificados” se usan en una síntesis dependiente de enzima y molde de tipo PCR. Los cebadores pueden modificarse marcando con un resto de captura (por ejemplo, biotina) y/o un resto detector (por ejemplo, enzima). En la segunda aplicación, se añade un exceso de sondas marcadas a una muestra. En presencia de la secuencia diana, la sonda se une y se escinde de forma catalítica. Después de la escisión, la secuencia diana se libera intacta para unirse por la sonda en exceso. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia diana.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS) (Kwoh y col., 1989; Publicación de Solicitud de Patente Internacional de PCT N° WO 88/10315, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad), incluyendo amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) y 3SR. En NASBA, los ácidos nucleicos pueden prepararse para amplificación por extracción de cloroformo/fenol convencional, desnaturalización por calor de una muestra, tratamiento con tampón de lisis y columnas minispín para aislamiento de ADN y ARN o extracción por cloruro de guanidinio de ARN. Estas técnicas de amplificación implican hibridar un cebador que tiene secuencias específicas para la secuencia diana. Después de la polimerización, se digieren híbridos de ADN/ARN con RNasaH mientras que las moléculas de ADN bicatenarias se desnaturalizan por calor de nuevo. En cualquiera de los casos el ADN monocatenario se hace completamente bicatenario por adición de un segundo cebador específico de diana, seguido de polimerización. Las moléculas de ADN bicatenarias se transcriben después de forma múltiple por una polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los ARN se transcriben de forma inversa a ADN y se transcriben una vez más con una polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, tanto truncados como completos, indican secuencias específicas de diana.

La Publicación de Solicitud de Patente Europea N° 329.822, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad, desvela un procedimiento de amplificación de ácido nucleico que implica sintetizar de forma clínica ARN monocatenario (“ARNmc”), ADNmc y ADN bicatenario (ADNbc), que pueden usarse de acuerdo con la presente invención. El ARNbc es un primer molde para un primer oligonucleótido cebador, que se elonga por transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN). El ARN se retira después de la doble cadena de ADN:ARN resultante mediante la acción de ribonucleasa H (RNasa H, una RNasa específica para ARN en una doble cadena con ADN o ARN). El ADNmc resultante es un segundo molde para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un promotor de ARN polimerasa (ejemplificado por ARN polimerasa T7) 5' de su homología con su

molde. Este cebador se extiende después por ADN polimerasa (ejemplificada por el fragmento grande "Klenow" de ADN polimerasa I de *E. coli*), dando como resultado una molécula de ADN bicatenaria ("ADNbc"), que tiene una secuencia idéntica con la del ARN original entre los cebadores y que tiene adicionalmente, en un extremo, una secuencia promotora. Esa secuencia promotora puede usarse por la ARN polimerasa apropiada para realizar muchas copias de ARN del ADN. Estas copias pueden después volver a entrar en el ciclo que conduce a amplificación muy rápida. Con la selección apropiada de enzimas, esta amplificación puede hacerse de forma isotérmica sin adición de enzimas en cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este procedimiento, puede seleccionarse la secuencia de partida para que esté en forma de ADN o ARN.

La Publicación de Solicitud de Patente Internacional de PCT N° WO 89/06700, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad, desvela un esquema de amplificación de secuencia de ácido nucleico basado en la hibridación de una secuencia de cebador/promotor para un ADN monocatenario diana ("ADNmc") seguido de transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir no se producen nuevos moldes a partir de los transcritos de ARN resultantes. Otros procedimientos de amplificación incluyen "RACE" (Frohman, 1990), y "PCR unilateral" (Ohara, 1989) que se conocen bien por los expertos en la materia.

También pueden usarse procedimientos basados en la ligación de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de ácido nucleico que tiene la secuencia del "dioligonucleótido" resultante, amplificando de este modo el dioligonucleótido (Wu y Dean, 1996, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad), en la amplificación de secuencias de ADN de la presente invención.

#### 4.15 Técnicas de suministro de polinucleótidos *in vivo*

En realizaciones adicionales, se introducen construcciones genéticas que comprenden uno o más de los polinucleótidos de la invención en células *in vivo*. Esto puede conseguirse usando cualquiera de una diversidad de enfoques bien conocidos, varios de los cuales se describen a continuación con el fin de ilustrar.

##### 4.15.1 Adenovirus

Uno de los procedimiento preferidos para suministro *in vivo* de una o más secuencias de ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión adenovirus. Se entiende que "vector de expresión de adenovirus" incluye las construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento de la construcción y (b) expresar un polinucleótido que se ha clonado en la misma en una orientación sentido o antisentido. Por supuesto, en el contexto de una construcción antisentido, la expresión no requiere que se sintetice el producto génico.

El vector de expresión comprende una forma obtenida por ingeniería genética de un adenovirus. El conocimiento de la organización genética de adenovirus, un virus de ADN bicatenario lineal de 36 kb, permite la sustitución de grandes trozos de ADN adenoviral con secuencias ajenas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992). A diferencia de retrovirus, la infección adenoviral de células huésped no da como resultado integración cromosómica debido a que el ADN adenoviral puede replicarse de una manera episomal sin genotoxicidad potencial. Además, los adenovirus son estructuralmente estables y no se ha detectado reordenación genómica después de amplificación extensiva. Los adenovirus pueden infectar virtualmente todas las células epiteliales independientemente de su etapa del ciclo celular. Hasta el momento parece que la infección adenoviral está ligada sólo a enfermedad suave tal como enfermedad respiratoria aguda en seres humanos.

El adenovirus es particularmente adecuado para su uso como un vector de transferencia de genes debido a su genoma de tamaño medio, facilidad de manipulación, alta titulación, amplio intervalo de células diana y alta infecciosidad. Ambos extremos del genoma viral contienen repeticiones invertidas de 100-200 pares de bases (ITR), que son elementos *in cis* necesarios para replicación de ADN viral y empaquetamiento. Las regiones temprana (E) y tardía (L) del genoma contienen diferentes unidades de transcripción que se dividen por la aparición de replicación de ADN viral. La región E1 (E1A y E1B) codifica proteínas responsables de la regulación de transcripción del genoma viral y unos pocos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) da como resultado la síntesis de las proteínas para replicación de ADN viral. Esas proteínas están implicadas en la replicación de ADN, expresión génica tardía y aislamiento de células huésped (Renan, 1990). Los productos de los genes tardíos, incluyendo la mayoría de las proteínas de cápsida viral, se expresan solamente después de procesamiento significativo de un transcrito primario sencillo emitido por el promotor tardío principal (MLP). El MLP, (localizado a 16,8 m.u.) es particularmente eficaz durante la fase tardía de infección y todos los ARNm emitidos a partir de este promotor poseen una secuencia líder tripartita 5' (TPL) que los hace ARNm preferidos para traducción.

En un sistema actual, se genera adenovirus recombinante a partir de recombinación homóloga entre vector lanzadera y vector provirus. Debido a la posible recombinación entre dos vectores provirales, puede generarse adenovirus de tipo silvestre a partir de este procedimiento. Por lo tanto, es crítico aislar un clon sencillo de virus de una placa individual y examinar su estructura genómica.

La generación y propagación de los vectores de adenovirus actuales, que son deficientes en replicación, depende de una línea de células auxiliares única, designada 293, que se transformó a partir de células de riñón embrionario

humano por fragmentos de ADN Ad5 y expresa constitutivamente proteínas E1 (Graham y col., 1977). Puesto que la región E3 es prescindible del genoma de adenovirus (Jones y Shenk, 1978), los actuales vectores de adenovirus con la ayuda de células 293, portan ADN ajeno en la región E1, la D3 o ambas (Graham y Prevec, 1991). En la naturaleza, los adenovirus pueden empaquetar aproximadamente 105 % del genoma de tipo silvestre (Ghosh-Choudhury y col., 1987), proporcionando una capacidad de aproximadamente 2 kb extra de ADN. En combinación con los aproximadamente 5,5 kb de ADN que son reemplazables en las regiones E1 y E3, la máxima capacidad del vector de adenovirus actual está por debajo de 7,5 kb o aproximadamente 15 % de la longitud total del vector. Más del 80 % del genoma viral de adenovirus permanece en la cadena principal del vector y es la fuente de citotoxicidad portada por vectores. Además, la deficiencia de replicación del virus con E1 suprimido es incompleta. Por ejemplo, se ha observado filtración de la expresión del gen viral con los vectores actualmente disponibles a altas multiplicidades de infección (MOI) (Mulligan, 1993).

Pueden derivarse líneas celulares auxiliares de células humanas tales como células de riñón embrionario humano, células musculares, células hematopoyéticas u otras células epiteliales o mesenquimales embrionarias humanas. Como alternativa, las células auxiliares pueden derivarse de las células de otras especies de mamífero que son permisivas para adenovirus humano. Tales células incluyen, por ejemplo, células Vero u otras células epiteliales o mesenquimales embrionarias de mono. Como se ha indicado anteriormente, la línea celular auxiliar preferida actualmente es 293.

Recientemente, Racher y col. (1995) desveló procedimientos mejorados para cultivar células 293 y propagar adenovirus. En un formato, se cultivan agregados celulares naturales inoculando células individuales en matraces de agitación con silicona de 1 litro (Techne, Cambridge, Reino Unido) que contienen 100-200 ml de medio. Después de agitación a 40 rpm, la viabilidad celular se estima con azul de tripano. En otro formato, se emplean microvehículos Fibra-Cel (Bibby Sterlin, Stone, Reino Unido) (5 g/l) como sigue. Se añade un inóculo celular, resuspendido en 5 ml de medio, al vehículo (50 ml) en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml y se deja inmóvil, con agitación ocasional, durante de 1 a 4 horas. El medio se reemplaza después con 50 ml de medio fresco y se inicia la agitación. Para producción de virus, se deja crecer a las células hasta aproximadamente 80 % de confluencia, se reemplaza el medio después de dicho tiempo (al 25 % del volumen final) y se añade adenovirus a una MOI de 0,05. Los cultivos se dejan inmóviles durante una noche, después de lo cual el volumen se aumenta a 100 % y comienza la agitación durante otras 72 horas.

Además del requisito de que el vector de adenovirus sea defectuoso para replicación, o al menos condicionalmente defectuoso, no se cree que la naturaleza del vector de adenovirus sea crucial para la práctica exitosa de la invención. El adenovirus puede ser de cualquiera de los 42 serotipos conocidos diferentes o subgrupos A-F. El adenovirus tipo 5 del subgrupo C es el material de partida preferido para obtener un vector de adenovirus defectuoso en replicación condicional para su uso en la presente invención, puesto que el adenovirus de tipo 5 es un adenovirus humano acerca del que se conoce una gran cantidad de información bioquímica y genética y se ha usado históricamente para la mayoría de las construcciones que emplean adenovirus como un vector.

Como se ha indicado anteriormente, el vector típico de acuerdo con la presente invención es defectuoso en replicación y no tendrá una región de adenovirus E1. Por lo tanto, será más conveniente introducir el polinucleótido que codifica el gen de interés en la posición de la que se han retirado las secuencias codificantes de E1. Sin embargo, la posición de inserción de la construcción dentro de las secuencias de adenovirus no es crítica para la invención. El polinucleótido que codifica el gen de interés también puede insertarse en sustitución de la región E3 suprimida en los vectores de reemplazo de E3 como se ha descrito por Karlsson y col. (1986) o en la región E4 en la que una línea celular auxiliar o virus colaborador complementa el defecto de E4.

El adenovirus es fácil de cultivar y manipular y muestra un amplio intervalo de huésped *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus puede obtenerse en altas titulaciones, por ejemplo,  $10^9$ - $10^{11}$  unidades formadoras de placas por ml y son altamente infecciosos. El ciclo de vida del adenovirus no requiere integración en el genoma de la célula huésped. Los genes ajenos suministrados por vectores de adenovirus son episomales y, por lo tanto, tienen baja genotoxicidad para células huésped. No se ha notificado efectos secundarios en estudios de vacunación con adenovirus de tipo silvestre (Couch y col., 1963; Top y col., 1971), lo que demuestra su seguridad y potencial terapéutico como vectores de transferencia génica *in vivo*.

Se han usado vectores de adenovirus en expresión génica de eucariotas (Levrero y col., 1991; Gomez-Foix y col., 1992) y desarrollo de vacunas (Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1992). Recientemente, estudios animales han sugerido que el adenovirus recombinante podría usarse para terapia génica (Stratford-Perricaudet y Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet y col., 1990; Rich y col., 1993). Los estudios de administración de adenovirus recombinante a diferentes tejidos incluyen instilación de tráquea (Rosenfeld y col., 1991; Rosenfeld y col., 1992), inyección muscular (Ragot y col., 1993), inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993) e inoculación estereotáctica en el cerebro (Le Gal La Salle y col., 1993).

#### 4.15.2 Retrovirus

Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenarios caracterizados por una capacidad para convertir su ARN a ADN bicatenario en células infectadas por un procedimiento de transcripción inversa (Coffin, 1990). El ADN

5 resultante se integra después de forma estable en cromosomas celulares como un provirus y dirige la síntesis de proteínas virales. La integración da como resultado la retención de las secuencias génicas virales en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retroviral contiene tres genes, gag, pol y env que codifican proteínas de la cápsida, enzima polimerasa y componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia hallada cadena arriba del gen gag contiene una señal para empaquetamiento del genoma en viriones. Dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) están presentes en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Estas contienen secuencias promotoras y potenciadoras fuertes y también se requieren para la integración en el genoma celular huésped (Coffin, 1990).

10 Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico que codifica una o más secuencias oligonucleotídicas o polinucleotídicas de interés en el genoma viral en lugar de ciertas secuencias virales para producir un virus que es defectuoso en replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y env pero sin los componentes de empaquetamiento y LTR (Mann y col., 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con las secuencias de empaquetamiento y LTR retrovirales en esta línea celular (por precipitación de fosfato cálcico por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas virales, que después se secretan al medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann y col., 1983). Los medios que contienen los retrovirus recombinantes se recogen después, opcionalmente se concentran y se usan para transferencia génica. Los vectores retrovirales son capaces de infectar una amplia diversidad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y expresión estable requieren la división de células huésped (Paskind y col., 1975).

20 Se desarrolló recientemente un enfoque nuevo diseñado para permitir la dirección específica de vectores retrovirales basándose en la modificación química de un retrovirus por la adición química de restos de lactosa a la envoltura viral. Esta modificación podría permitir la infección específica de hepatocitos mediante receptores de sialoglucoproteínas.

25 Se diseñó un enfoque diferente para dirigirse a retrovirus recombinantes en el que se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de envoltura retroviral y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux y col., 1989). Usando anticuerpos contra los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y clase II, demostraron la infección de una diversidad de células humanas que portaban esos antígenos de superficie con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux y col., 1989).

#### 4.15.3 Virus adenoasociados

30 AAV (Ridgeway, 1988; Hermonat y Muzyczka, 1984) es un parvovirus, descubierto como una contaminación de reservas adenovirales. Es un virus ubicuo (los anticuerpos están presentes en el 85 % de la población humana de Estados Unidos) que no se ha ligado a ninguna enfermedad. También se clasifica como un dependovirus, porque sus replications dependen de la presencia de un virus colaborador, tal como adenovirus. Se han aislado cinco serotipos, de los cuales AAV-2 es el mejor caracterizado. AAV tiene un ADN lineal monocatenario que está encapsulado en proteínas de cápsida VP1, VP2 y VP3 para formar un virión icosaédrico de 20 a 24 nm de diámetro (Muzyczka y McLaughlin, 1988).

35 El ADN de AAV es de aproximadamente 4,7 kilobases de largo. Contiene dos fases abiertas de lectura y está flanqueado por dos ITR. Existen dos genes principales en el genoma de AAV: *rep* y *cap*. El gen *rep* codifica proteínas responsables de replications virales, mientras que *cap* codifica la proteína de cápsida VP1-3. Cada ITR forma una estructura en horquilla con forma de T. Estas repeticiones terminales son los únicos componentes cis esenciales del AAV para integración cromosómica. Por lo tanto, el AAV puede usarse como un vector con todas las secuencias codificantes virales retiradas y reemplazarse por el casete de genes para suministro. Se han identificado tres promotores virales y se han denominado p5, p19, y p40, de acuerdo con su posición en el mapa. La transcripción de p5 y p19 da como resultado producción de proteínas rep y la transcripción de p40 produce las proteínas de la cápsida (Hermonat y Muzyczka, 1984).

40 Existen varios factores que han impulsado a los investigadores a estudiar la posibilidad de usar rAAV como un vector de expresión. Uno es que los requisitos para suministrar un gen para integrarlo en el cromosoma huésped son sorprendentemente pocos. Es necesario tener las ITR de 145 pb, que solamente son el 6 % del genoma de AAV. Esto deja espacio en el vector para ensamblar un inserto de ADN de 4,5 kb. Aunque esta capacidad de transporte puede evitar que el AAV suministre grandes genes, es ampliamente adecuado para suministrar las construcciones antisentido de la presente invención-

45 AAV también es una buena elección para vehículos de suministro debido a su seguridad. Existe un mecanismo de rescate relativamente complicado: se requieren no solamente adenovirus de tipo silvestre sino también genes de AAV para movilizar rAAV. De forma similar, AAV no es patógeno y no se asocia con ninguna enfermedad. La retirada de secuencias codificantes virales minimiza las reacciones inmunes a la expresión génica viral y, por lo tanto, rAAV no induce una respuesta inflamatoria.

#### 4.15.4 Otros vectores virales como construcciones de expresión

Pueden emplearse otros vectores virales como construcciones de expresión en la presente invención para el



suministro de secuencias oligonucleotídicas o polinucleotídicas a una célula huésped. Pueden emplearse vectores derivados de virus tales como virus vaccinia (Ridgeway, 1988; Coupar y col., 1988), lentivirus, virus de la polio y virus de herpes. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Coupar y col., 1988; Horwich y col., 1990). Con el reciente reconocimiento de virus de hepatitis B defectuosos, se han obtenidos nuevos conocimientos sobre la relación estructura-función de diferentes secuencias virales. Estudios *in vitro* mostraron que el virus podría conservar la capacidad de empaquetamiento dependiente de colaborador y la transcripción inversa a pesar de la delección de hasta el 80 % de su genoma (Horwich y col., 1990). Esto sugirió que grandes partes del genoma podrían reemplazarse con material genético ajeno. El hepatotropismo y persistencia (integración) fueron propiedades particularmente reactivas para transferencia génica dirigida a hígado. Chang y col. (1991) introdujo el gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en genoma de virus de la hepatitis B de pato en lugar de las secuencias codificantes de polimerasa, superficie y presuperficie. Se cotransfectó con virus de tipo silvestre en una línea celular de hepatoma aviar. Se usaron medios de cultivo que contenían altas titulaciones del virus recombinante para infectar hepatocitos de patos jóvenes primarios. Se detectó expresión del gen CAT estable durante al menos 24 días después de la transfección (Chang y col., 1991).

#### 15 4.15.5 Vectores no virales

Para efectuar la expresión de las secuencias oligonucleotídicas o polinucleotídicas de la presente invención, la construcción de expresión debe suministrarse a una célula. Este suministro puede conseguirse *in vitro*, como en procedimientos de laboratorio para transformar líneas celulares, o *in vivo* o *ex vivo*, como el tratamiento de ciertas patologías. Como se ha descrito anteriormente, un mecanismo preferido para suministro es mediante infección viral en la que la construcción de expresión se encapsula en una partícula viral infecciosa.

Una vez que se ha suministrado la construcción de expresión a la célula el ácido nucleico que codifica las secuencias oligonucleotídicas o polinucleotídicas deseadas puede posicionarse y expresarse en diferentes sitios. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la construcción puede integrarse de forma estable en el genoma de la célula. Esta integración puede ser en la localización y orientación específica mediante recombinación homóloga (reemplazo génico) o puede integrarse en una localización aleatoria no específica (aumento génico). En más realizaciones adicionales, el ácido nucleico puede mantenerse de forma estable en la célula como un segmento separado episomal de ADN. Tales segmentos de ácido nucleico o "epitomas" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y replicación independiente de o en sincronización con el ciclo celular del huésped. Como se suministra la construcción de expresión a una célula y donde permanece el ácido nucleico en la célula depende del tipo de construcción de expresión empleado.

En ciertas realizaciones de la invención, la construcción de expresión que comprende una o más secuencias oligonucleotídicas o polinucleotídicas puede consistir simplemente en ADN recombinante desnudo o plásmidos. La transferencia de la construcción puede realizarse por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente que permeabilizan física o químicamente la membrana celular. Esto es particularmente aplicable para transferencia *in vitro* pero puede aplicarse a uso *in vivo* también. Dubensky y col. (1984) inyectó de forma exitosa ADN poliomavirus en forma de precipitados de fosfato cálcico en hígado y bazo de ratones adultos y neonatos demostrando replicación viral activa e infección aguda. Benvenisty y Reshef (1986) también demostraron que la inyección intraperitoneal directa de plásmidos precipitados con fosfato cálcico da como resultado la expresión de los genes transfectados. Se prevé que el ADN que codifica un gen de interés también puede transferirse de una manera similar *in vivo* y expresar el producto génico.

Otra realización de la invención para transferir una construcción de expresión de ADN desnudo en células puede implicar bombardeo de partículas. Este procedimiento depende de la capacidad para acelerar microproyectiles revestidos con ADN a una alta velocidad permitiéndoles atravesar membranas celulares y entrar en células sin matarlas (Klein y col., 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Un dispositivo tal se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang y col., 1990). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como tungsteno o perlas de oro.

Se han bombardeado órganos seleccionados incluyendo el hígado, piel y tejido muscular de ratas y ratones *in vivo* (Yang y col., 1990; Zelenin y col., 1991). Esto puede requerir exposición quirúrgica del tejido o células, para eliminar cualquier tejido intermedio entre la pistola y el órgano diana, es decir tratamiento *ex vivo*. De nuevo, puede suministrarse ADN que codifica un gen particular mediante este procedimiento y aún incorporarse por la presente invención.

#### 4.16 Oligonucleótidos antisentido

El resultado final del flujo de información genética es la síntesis de proteína. Se transcribe ADN por polimerasas a ARN mensajero y se traduce en el ribosoma para producir una proteína funcional plegada. Por lo tanto existen varias etapas a lo largo de la ruta en las que la síntesis proteica puede inhibirse. El segmento de ADN nativo que codifica un polipéptido descrito en el presente documento, como todas las cadenas de ADN de mamífero, tiene dos cadenas: una cadena sentido y una cadena antisentido mantenidas unidas por enlaces de hidrógeno. El ARN mensajero que codifica el polipéptido tiene la misma secuencia de nucleótidos que la hebra de ADN sentido excepto que la timidina

de ADN se reemplaza por uridina. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos antisentido sintéticas se unirán a un ARNm e inhibirán la expresión de la proteína modificada por ese ARNm.

La dirección de oligonucleótidos antisentido a ARNm es por lo tanto un mecanismo para suprimir la síntesis proteica y, en consecuencia, representa un enfoque terapéutico diana y potente. Por ejemplo, la síntesis de poligalacturonasa y el receptor de acetil colina muscarínico de tipo 2 se inhibe por oligonucleótidos antisentido dirigidos a sus secuencias de ARNm respectivas (Patente de Estados Unidos 5.739.119 y Patente de Estados Unidos 5.759.829, cada una incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad). Además, se han demostrado ejemplos de inhibición antisentido con la proteína nuclear ciclina, el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptor de GABA<sub>A</sub> estriada y EGF humano (Jaskulski y col., 1988; Vasanthakumar y Ahmed, 1989; Peris y col., 1998; Patente de Estados Unidos 5.801.154; Patente de Estados Unidos 5.789.573; Patente de Estados Unidos 5.718.709 y Patente de Estados Unidos 5.610.288, cada una incorporada específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad). También se han descrito construcciones antisentido que inhiben y pueden usarse para tratar una diversidad de proliferaciones celulares anómalas, por ejemplo cáncer (Patente de Estados Unidos 5.747.470; Patente de Estados Unidos 5.591.317 y Patente de Estados Unidos 5.783.683, incorporada cada una específicamente en el presente documento por referencia en su totalidad).

Por lo tanto, en realizaciones ejemplares, la invención proporciona secuencias oligonucleotídicas que comprenden toda, o una parte de, cualquier secuencia que es capaz de unirse específicamente a secuencias polinucleotídicas descritas en el presente documento o un complemento de las mismas. En una realización, los oligonucleótidos antisentido comprenden ADN o derivados del mismo. En otra realización, los oligonucleótidos comprenden ARN o derivados del mismo. En una tercera realización, los oligonucleótidos son ADN modificados que comprenden una cadena principal modificada fosforotioatada. En una cuarta realización, las secuencias oligonucleotídicas comprenden ácidos peptidonucleicos o derivados de los mismos. En cada caso, las composiciones preferidas comprenden una región de secuencia que es complementaria, y más preferentemente sustancialmente complementaria, incluso más preferentemente, completamente complementaria, a una o más partes de los polinucleótidos desvelados en el presente documento.

La selección de composiciones antisentido específicas para una secuencia génica dada se basa en el análisis de la secuencia diana seleccionada (es decir en estos ejemplos ilustrativos las secuencias de rata y humanas) y la determinación de estructura secundaria, T<sub>m</sub>, energía de unión, estabilidad relativa y composiciones antisentido se seleccionaron basándose en su incapacidad relativa para formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían o impedirían la unión específica al ARNm diana en una célula huésped.

Son regiones diana altamente preferidas del ARNm, las que están en o cerca del codón de inicio de la traducción AUG y las secuencias que eran sustancialmente complementarias a regiones 5' del ARNm. Estos análisis de estructura secundaria y consideraciones de selección de sitio diana se realizaron usando v.4 del software de análisis de cebadores OLIGO (Rychlik, 1997) y el software de algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul y col., 1997).

El uso de un procedimiento de suministro antisentido que emplea un vector peptídico corto denominado MPG (27 restos), también se contempla. El péptido de MPG contiene un dominio hidrófobo derivado de la secuencia de fusión de gp41 de VIH y un dominio hidrófilo de la secuencia de localización nuclear del antígeno T de SV40 (Morris y col., 1997). Se ha demostrado que varias moléculas del péptido MPG revisten los oligonucleótidos antisentido y pueden suministrarse a células de mamífero cultivadas en menos de 1 hora con eficacia relativamente alta (90 %). Además, la interacción con MPG aumenta en gran medida tanto en la estabilidad del oligonucleótido para nucleasa como la capacidad de cruzar la membrana plasmática (Morris y col., 1997).

#### 4.17 Ribozimas

Aunque se han usado tradicionalmente proteínas para catálisis de ácidos nucleicos, ha aparecido otra clase de macromoléculas como útiles para este esfuerzo. Las ribozimas son complejos de ARN-proteína que escinden ácidos nucleicos de una manera específica de sitio. Las ribozimas tiene dominios catalíticos específicos que poseen actividad endonucleasa (Kim y Cech, 1987; Gerlach y col., 1987; Forster y Symons, 1987). Por ejemplo, un gran número de ribozimas acelera las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, escindiendo con frecuencia solamente uno de varios fosfoésteres en un sustrato oligonucleotídico (Cech y col., 1981; Michel y Westhof, 1990; Reinhold-Hurek y Shub, 1992). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se una mediante interacciones de formación de pares de bases específicas con la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

Se ha observado catálisis de ribozimas principalmente como parte de reacciones de escisión/ligación específicas de secuencia que implican ácidos nucleicos (Joyce, 1989; Cech y col., 1981). Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.354.855 (incorporada específicamente en el presente documento por referencia) indica que ciertas ribozimas pueden actuar como endonucleasas con una mayor especificidad de secuencia que la de ribonucleasas conocidas y cercana a la de las enzimas de restricción de ADN. Por lo tanto, la inhibición mediada por ribozimas específicas de secuencias de la expresión génica puede ser particularmente adecuada para aplicaciones terapéuticas (Scanlon y col., 1991; Sarver y col., 1990). Recientemente, se ha notificado que las ribozimas indujeron

cambios genéticos en algunas líneas celulares a las que se aplicaron; los genes alterados incluían los oncogenes *H-ras*, *c-fos* y genes de VIH. La mayor parte de este trabajo implicó la modificación de un ARNm diana, basándose en un codón mutante específico que se escinde por una ribozima específica.

5 Se conocen en la actualidad seis variedades básicas de ARN enzimáticos de origen natural. Cada uno puede catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster de ARN en *trans* (y por lo tanto puede escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión a diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en proximidad cercana a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y después se une a un ARN diana a través de formación de pares de bases complementarias y, una vez unido al sitio correcto, actúa de forma enzimática para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya unido y haya escindido su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

15 La naturaleza enzimática de una ribozima es ventajosa frente a muchas tecnologías, tales como la tecnología antisentido (en la que una molécula de ácido nucleico se une simplemente a una diana de ácido nucleico para bloquear su traducción) puesto que la concentración de ribozima necesaria para afectar a un tratamiento terapéutico es menor que la de un oligonucleótido antisentido. Esta ventaja refleja la capacidad de la ribozima para actuar enzimáticamente. Por lo tanto, una molécula de ribozima sencilla es capaz de escindir muchas moléculas de ARN diana. Además, la ribozima es un inhibidor altamente específico, dependiendo la especificidad de inhibición no solamente del mecanismo por formación de pares de bases de unión al ARN diana, sino también del mecanismo de escisión de ARN diana. Los emparejamientos erróneos sencillos, o sustituciones de bases, cerca del sitio de escisión pueden eliminar completamente la actividad catalítica de una ribozima. Los emparejamientos erróneos similares en moléculas antisentido no evitan su acción (Woolf y col., 1992). Por lo tanto, la especificidad de acción de una ribozima es mayor que la de un oligonucleótido antisentido que se une al mismo sitio de ARN.

25 La molécula de ácido nucleico enzimático puede formarse en un motivo de cabeza de martillo, horquilla, un virus de hepatitis  $\delta$ , intrón de grupo I o ARN de RNasaP (en asociación con una secuencia guía de ARN) o ARN VS de *Neurospora*. Se describen ejemplos de motivos de cabeza de martillo en Rossi y col. (1992). Se describen ejemplos de motivos de horquilla en Hampel y col. (Publicación de Solicitud de Patente Europea N° EP 0360257), Hampel y Tritz (1989), Hampel y col. (1990) y Patente de Estados Unidos 5.631.359 (incorporada específicamente en el presente documento por referencia). Se describe un ejemplo del motivo de virus de hepatitis  $\delta$  en Perrotta y Been (1992); se describe un ejemplo del motivo de RNasaP en Guerrier-Takada y col. (1983); se describe un motivo de ribozima de ARN VS de *Neurospora* en Collins (Saville y Collins, 1990; Saville y Collins, 1991; Collins y Olive, 1993); y se describe un ejemplo de intrón de Grupo I en (Patente de Estados Unidos 4.987.071, incorporada específicamente en el presente documento por referencia). Todo lo que es importante en una molécula de ácido nucleico enzimático de la presente invención es que tiene un sitio de unión a sustrato específico que es complementario a una o más de las regiones de ARN del gen diana y que tiene secuencias de nucleótidos dentro de o rodeando el sitio de unión a sustrato que proporciona una actividad de escisión de ARN a la molécula. Por lo tanto las construcciones de ribozimas no necesitan estar limitadas a los motivos específicos mencionados en el presente documento.

40 En ciertas realizaciones, puede ser importante producir agentes de escisión enzimática que muestren un alto grado de especificidad por el ARN de una diana deseada, tal como una de las secuencias desveladas en el presente documento. La molécula de ácido nucleico enzimático se dirige preferentemente a una región de secuencia altamente conservada de un ARNm diana. Dichas moléculas de ácido nucleico enzimático pueden suministrarse de forma exógena a células específicas según se requiera. Como alternativa, las ribozimas pueden expresarse de vectores de ADN o ARN que se suministran a células específicas.

45 También pueden usarse motivos de ácido nucleico enzimático pequeños (por ejemplo, de la estructura de cabeza de martillo u horquilla) para suministro exógeno. La estructura sencilla de estas moléculas aumenta la capacidad del ácido nucleico enzimático para invadir regiones diana de la estructura de ARNm. Como alternativa, las moléculas de ARN catalítico pueden expresarse dentro de células de promotores eucariotas (por ejemplo, Scanlon y col., 1991; Kashani-Sabet y col., 1992; Dropulic y col., 1992; Weerasinghe y col., 1991; Ojwang y col., 1992; Chen y col., 1992; Sarver y col., 1990). Los expertos en la materia saben que cualquier ribozima puede expresarse en células eucariotas del vector de ADN apropiado. La actividad de tales ribozimas puede aumentarse mediante su liberación del transcrito primario por una segunda ribozima (Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 93/23569, y Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/02595, ambas incorporadas por la presente por referencia; Ohkawa y col., 1992; Taira y col., 1991; y Ventura y col., 1993).

Pueden añadirse ribozimas directamente o pueden formar complejos con lípidos catiónicos, complejos lipídicos, empaquetarse dentro de liposomas o suministrarse de otro modo a células diana. Los complejos de ADN o ARN pueden administrarse localmente a tejidos relevantes *ex vivo* o *in vivo* a través de inyección, inhalación de aerosol, bomba de infusión o endoprótesis vascular, con o sin su incorporación en biopolímeros.

60 Pueden diseñarse ribozimas como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO

93/23569 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/02595, incorporada cada una específicamente en el presente documento por referencia) y sintetizarse para ensayarse *in vitro* e *in vivo*, como se describe. Tales ribozimas también pueden optimizarse para suministro. Aunque se proporcionan ejemplos específicos, los expertos en la materia reconocerán que pueden utilizarse dianas de ARN equivalentes en otras especies cuando sea necesario.

Las ribozimas en cabeza de martillo u horquilla pueden analizarse individualmente mediante plegamiento informático (Jaeger y col., 1989) para evaluar si las secuencias de ribozimas se pliegan en la estructura secundaria apropiada. Las ribozimas con interacciones intramoleculares desfavorables entre las ramas de unión y el núcleo catalítico se eliminan de la consideración. Pueden seleccionarse diversas longitudes de ramas de unión para optimizar la actividad. Generalmente, al menos aproximadamente 5 bases de cada rama son capaces de unirse a, o interaccionar de otro modo con, el ARN diana.

Las ribozimas del motivo de cabeza de martillo u horquilla pueden diseñarse para hibridar con diversos sitios en el mensaje de ARNm y pueden sintetizarse químicamente. El procedimiento de síntesis usado sigue el procedimiento para síntesis de ARN normal como se describe en Usman y col. (1987) y en Scaringe y col. (1990) y hace uso de grupos de acoplamiento y protección de ácido nucleico habituales, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. Los rendimientos de acoplamiento medios por etapas son típicamente >98 %. Pueden sintetizarse ribozimas en horquilla en dos partes e hibridarse para reconstruir una ribozima activa (Chowrira y Burke, 1992). Pueden modificarse las ribozimas de forma exhaustiva para potenciar la estabilidad por modificación con grupos resistentes a nucleasa, por ejemplo, 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-fluro, 2'-o-metilo, 2'-H (para un revisión véase, por ejemplo, Usman y Cedergren, 1992). Las ribozimas pueden purificarse por electroforesis en gel usando procedimientos generales o mediante cromatografía líquida de alta presión y resuspenderse en agua.

La actividad de ribozimas puede optimizarse alterando la longitud de las ramas de unión a ribozima o sintetizando químicamente ribozimas con modificaciones que evitan su degradación por ribonucleasas del suero (véase por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 92/07065; Perrault y col., 1990; Pieken y col., 1991; Usman y Cedergren, 1992; Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 93/15187; Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 91/03162; Publicación de Solicitud de Patente Europea N° 92110298.4; Patente de Estados Unidos 5,334,711; y Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/13688, que describen diversas modificaciones químicas que pueden realizarse a los restos de azúcares de moléculas de ARN enzimático), modificaciones que potencian su eficacia en células y retirada de bases de tallo II para acortar los tiempos de síntesis de ARN y reducir los requisitos químicos.

Sullivan y col. (Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/02595) describe los procedimientos generales para suministro de moléculas de ARN enzimático. Pueden administrarse ribozimas a células por una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin restricción, encapsulación en liposomas, por iontoforesis o por incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas. Para algunas indicaciones, las ribozimas pueden suministrarse directamente *ex vivo* a células o tejidos con o sin los vehículos anteriormente mencionados. Como alternativa, la combinación de ARN/vehículo puede suministrarse localmente por inhalación directa, por inyección directa o mediante el uso de un catéter, bomba de difusión o endoprótesis vascular. Otras vías de suministro incluyen, pero sin limitación, inyección intravascular, intramuscular, subcutánea o de articulaciones, inhalación de aerosol, suministro oral (forma de comprimido o píldora), tópico, sistémico, ocular, intraperitoneal y/o intratecal. Se proporcionan descripciones más detalladas de suministro y administración de ribozimas en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/02595 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 93/23569, incorporada cada una específicamente por referencia en el presente documento.

Otro medio para acumular altas concentraciones de una ribozima o ribozimas dentro de células es incorporar las secuencias que codifican ribozimas en un vector de expresión de ADN. La transcripción de las secuencias de ribozimas se dirige desde un promotor para ARN polimerasa I (pol I), ARN polimerasa II (pol II) o ARN polimerasa III (pol III) eucariota. Los transcritos de promotores de pol II o pol III se expresarán a altos niveles en todas las células; los niveles de un promotor de pol II dado en un tipo de célula dado dependerán de la naturaleza de las secuencias reguladoras génicas (potenciadores, silenciadores, etc.) presentes en las cercanías. También pueden usarse promotores de ARN polimerasa procariota, siempre que la enzima de ARN polimerasa procariota se exprese en las células apropiadas (Elroy-Stein y Moss, 1990; Gao y Huang, 1993; Lieber y col., 1993; Zhou y col., 1990). Las ribozimas expresadas de tales promotores pueden actuar en células de mamífero (por ejemplo Kashani-Saber y col., 1992; Ojwang y col., 1992; Chen y col., 1992; Yu y col., 1993; L'Huillier y col., 1992; Lisiewicz y col., 1993). Tales unidades de transcripción pueden incorporarse en una diversidad de vectores para su introducción en células de mamífero, incluyendo pero sin restricción, vectores de ADN plasmídicos, vectores de ADN virales (tales como adenovirus o vectores adenoasociados) o vectores de ARN virales (tales como vectores retrovirales, de virus del bosque semliki, vectores del virus sindbis).

Las ribozimas pueden usarse como herramientas de diagnóstico para examinar deriva genética y mutaciones dentro de células enfermas. También pueden usarse para evaluar niveles de la molécula de ARN diana. La relación cercana entre la actividad de la ribozima y la estructura de la ARN diana permite la detección de mutaciones en cualquier región de la molécula que altere la formación de pares de bases y la estructura tridimensional del ARN

diana. Usando múltiples ribozimas, se pueden mapear los cambios de nucleótidos que son importantes para la estructura y función del ARN *in vitro*, así como en células y tejidos. La escisión de ARN diana con ribozimas puede usarse para inhibir la expresión génica y definir el papel (esencialmente) de los productos génicos especificados en la progresión de enfermedad. De esta manera, pueden definirse otras dianas genéticas como mediadores importantes de la enfermedad. Estos estudios conducirán a mejor tratamiento de la progresión de enfermedad proporcionando la posibilidad de terapias de combinación (por ejemplo, múltiples ribozimas dirigidas a genes diferentes, ribozimas acopladas con moléculas pequeñas inhibitoras conocidas o tratamiento intermitente con combinaciones de ribozimas y/u otras moléculas químicas o biológicas). Otros usos de ribozimas *in vitro* se conocen bien en la técnica e incluyen detección de la presencia de ARNm asociado con una afección relacionada con IL-5. Dicho ARN se detecta determinando la presencia de un producto de escisión después de tratamiento con una ribozima usando metodología convencional.

#### 4.18 Ácidos peptidonucleicos

En ciertas realizaciones, los inventores contemplan el uso de ácidos peptidonucleicos (PNA) en la práctica de los procedimientos de la invención. PNA es un mimético de ADN en el que se unen las nucleobases a una cadena principal pseudopeptídica (Good y Nielsen, 1997). El PNA puede utilizarse en varios procedimientos que tradicionalmente han usado ARN o ADN. Con frecuencia las secuencias de PNA rinden mejor en técnicas que las secuencias de ARN o ADN correspondientes y tienen utilidades que no son inherentes a ARN o ADN. Se proporciona una revisión de PNA que incluye procedimientos para su preparación, características y procedimientos para su uso por Corey (1997) y se incorpora en el presente documento por referencia. Como tal, en ciertas realizaciones pueden prepararse secuencias de PNA que son complementarias a una o más partes de la secuencia de ARNm de ACE y dichas composiciones de PNA pueden usarse para regular, alterar, reducir o disminuir la traducción de ARNm específico de ACE y de este modo alterar el nivel de actividad de ACE en una célula huésped a la que se han administrado dichas composiciones de PNA.

Los PNA tienen engarces de 2-aminoetil-glicina que reemplazan la cadena principal de fosfodiéster normal de ADN (Nielsen y col., 1991; Hanvey y col., 1992; Hyrup y Nielsen, 1996; Neilsen, 1996). Esta química tiene tres consecuencias importantes: primero a diferencia de ADN u oligonucleótidos de fosforotioato, los PNA son moléculas neutras; en segundo lugar, los PNA son aquirales, lo que evita la necesidad de desarrollar una síntesis estereoselectiva; y en tercer lugar, la síntesis de PNA usa protocolos de Boc (Dueholm y col., 1994) o Fmoc (Thomson y col., 1995) convencionales para síntesis peptídica de fase sólida, aunque se han usado otros procedimientos, incluyendo un procedimiento de Merrifield modificado (Christensen y col., 1995).

Están disponibles en el mercado monómeros de PNA u oligómeros listos para usar de PerSeptive Biosystems (Framingham, MA). Las síntesis de PNA por protocolos de Boc o Fmoc son fáciles usando protocolos manuales o automáticos (Norton y col., 1995). El protocolo manual se presta a la producción de PNA modificados químicamente o la síntesis simultánea de familias de PNA cercanamente relacionados.

Como con la síntesis peptídica, el éxito de una síntesis de PNA particular dependerá de las propiedades de la secuencia seleccionada. Por ejemplo, aunque en teoría los PNA pueden incorporar cualquier combinación de bases nucleotídicas, la presencia de purinas adyacentes puede conducir a deleciones de uno o más restos en el producto. Previendo esta dificultad, se sugiere que al producir PNA con purinas adyacentes, debería repetirse el acoplamiento de restos que tienen probabilidades de añadirse de forma ineficaz. Esto debería seguirse de la purificación de PNA por cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (Norton y col., 1995) que proporciona rendimientos y pureza de producto similares a los observados durante la síntesis de péptidos.

Las modificaciones de PNA para una aplicación dada pueden conseguirse mediante el acoplamiento de aminoácidos durante síntesis de fase sólida o uniendo compuestos que contienen un grupo de ácido carboxílico a la amina N terminal expuesta. Como alternativa, los PNA pueden modificarse después de síntesis por acoplamiento con una lisina o cisteína introducida. La facilidad con la que los PNA pueden modificarse facilita la optimización para una mejor solubilidad o para requisitos funcionales específicos. Una vez sintetizados, la identidad de los PNA y sus derivados puede confirmarse por espectrometría de masas. Se han realizado varios estudios y se han utilizado modificaciones de PNA (Norton y col., 1995; Haaima y col., 1996; Stetsenko y col., 1996; Petersen y col., 1995; Ulmann y col., 1996; Koch y col., 1995; Orum y col., 1995; Footer y col., 1996; Griffith y col., 1995; Kremsky y col., 1996; Partridge y col., 1995; Boffa y col., 1995; Landsdorp y col., 1996; Gambacorti-Passerini y col., 1996; Armitage y col., 1997; Seeger y col., 1997; Ruskowski y col., 1997). La Patente de Estados Unidos N° 5.700.922 analiza moléculas químicas PNA-ADN-PNA y sus usos en diagnóstico, modulación de proteínas en organismos y tratamiento de afecciones susceptibles a agentes terapéuticos.

A diferencia de ADN y ARN, que contienen engarces cargados negativamente, la cadena principal de PNA es neutra. A pesar de esta dramática alteración, los PNA reconocen ADN y ARN complementario por formación de pares de Watson-Crick (Egholm y col., 1993), validando el modelo inicial de Nielsen y col. (1991). Los PNA carecen de polaridad 3' a 5' y pueden unirse en modo paralelo o antiparalelo prefiriéndose el modo antiparalelo (Egholm y col., 1993).

La hibridación de oligonucleótidos de ADN con ADN y ARN se desestabiliza por repulsión electrostática entre las

5 cadenas principales de fosfato cargadas negativamente de las cepas complementarias. Por el contrario, la ausencia de repulsión de carga en dobles cadenas PNA-ADN o PNA-ARN aumenta la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y reduce la dependencia de  $T_m$  en la concentración de cationes mono o divalentes (Nielsen y col., 1991). La tasa y afinidad de hibridación potenciadas son significativas porque son responsables de la sorprendente capacidad de los PNA para realizar invasión de cadena de secuencias complementarias dentro de ADN bicatenario relajado. Además, la hibridación eficaz en repeticiones invertidas sugiere que los PNA pueden reconocer estructuras secundarias de forma eficaz dentro de ADN bicatenario. También se produce reconocimiento potenciado con PNA inmovilizados en superficies y Wang y col. han mostrado que pueden usarse PNA unidos a soporte para detectar acontecimientos de hibridación (Wang y col., 1996).

10 Podría esperarse que la unión estrecha de los PNA con secuencias complementarias aumentara también la unión a secuencias similares (pero no idénticas), reduciendo la especificidad de secuencia del reconocimiento de PNA. Como con la hibridación de ADN, sin embargo, puede conseguirse reconocimiento selectivo equilibrando la longitud de los oligómeros y la temperatura de incubación. Además, la hibridación selectiva de los PNA se impulsa por que la hibridación de PNA-ADN es menos tolerante con los emparejamientos erróneos de bases que la hibridación de ADN-ADN. Por ejemplo, un emparejamiento erróneo sencillo dentro de una doble cadena PNA-ADN de 16 pb puede reducir la  $T_m$  en hasta 15 °C (Egholm y col., 1993). Este alto nivel de diferenciación ha permitido el desarrollo de varias estrategias basadas en PNA para el análisis de mutaciones puntuales (Wang y col., 1996; Carlsson y col., 1996; Thiede y col., 1996; Webb y Hurskainen, 1996; Perry-O'Keefe y col., 1996).

20 La unión de alta afinidad proporciona claras ventajas para el reconocimiento molecular y el desarrollo de nuevas aplicaciones para PNA. Por ejemplo, PNA de 11-13 nucleótidos inhiben la actividad de telomerasa, una ribonucleoproteína que extiende los extremos teloméricos usando un molde de ARN esencial, mientras que los oligómeros de ADN análogos no lo hacen (Norton y col., 1996).

25 Los PNA neutros son más hidrófobos que los oligómeros de ADN análogos y esto puede conducir a dificultad en su solubilización a pH neutro, especialmente si los PNA tienen un alto contenido en purina o si tienen el potencial para formar estructuras secundarias. Su solubilidad puede potenciarse uniendo una o más cargas positivas a los extremos terminales de PNA (Nielsen y col., 1991).

30 Hallazgos de Allfrey y colaboradores sugieren que se produce invasión de cadena de forma espontánea en secuencias dentro de ADN cromosómico (Boffa y col., 1995; Boffa y col., 1996). Estos estudios dirigieron PNA a repeticiones en triplete de los nucleótidos CAG y usaron este reconocimiento para purificar ADN activo transcripcionalmente (Boffa y col., 1995) y para inhibir la transcripción (Boffa y col., 1996). Este resultado sugiere que si pueden suministrarse PNA dentro de células entonces tendrán el potencial de ser reguladores de la expresión génica específicos de secuencia generales. Los estudios y revisiones con respecto al uso de PNA como agentes antisentido y antigénicos incluyen Nielsen y col. (1993b), Hanvey y col. (1992), y Good y Nielsen (1997). Koppelhus y col. (1997) han usado PNA para inhibir la transcripción inversa de VIH-1, mostrando que pueden usarse PNA para terapias antivirales.

35 Se analizan procedimientos de caracterización de las propiedades de unión antisentido de PNA en Rose (1993) y Jensen y col. (1997). Rose usa electroforesis en gel capilar para determinar la unión de PNA a sus oligonucleótidos complementarios, midiendo la cinética de unión relativa y estequiometría. Se realizaron tipos similares de mediciones por Jensen y col. usando tecnología BIAcore™.

40 Otras aplicaciones de PNA incluyen su uso en invasión de cadena de ADN (Nielsen y col., 1991), inhibición antisentido (Hanvey y col., 1992), análisis mutacional (Orum y col., 1993), potenciadores de la transcripción (Mollegaard y col., 1994), purificación de ácido nucleico (Orum y col., 1995), aislamiento de genes transcripcionalmente activos (Boffa y col., 1995), bloqueo de unión del factor de transcripción (Vickers y col., 1995), escisión de genoma (Veselkov y col., 1996), biosensores (Wang y col., 1996), hibridación *in situ* (Thisted y col., 1996) y en una alternativa a la transferencia de Southern (Peny-O'Keefe, 1996).

#### 4.19 Polipéptido, péptidos y variantes pépticas

50 La presente invención, en otros aspectos, proporciona composiciones polipeptídicas. En general, un polipéptido de la invención será un polipéptido aislado (o un epítipo, variante o fragmento activo del mismo) derivado de una especie de mamífero. Preferentemente, el polipéptido se codifica por una secuencia polinucleotídica desvelada en el presente documento o una secuencia que hibrida en condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia polinucleotídica desvelada en el presente documento. Como alternativa, el polipéptido puede definirse como un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua de una secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento o comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos completa desvelada en el presente documento.

55 En la presente invención, también se entiende que una composición polipeptídica comprende uno o más polipéptidos que son inmunológicamente reactivos con anticuerpos generados contra un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos codificada por los polinucleótidos desvelados, o fragmentos activos, o variantes o equivalentes funcionales biológicos de los mismos.

De forma similar, se entiende que una composición polipeptídica de la presente invención comprende uno o más polipéptidos que son capaces de inducir anticuerpos que son inmunológicamente reactivos con uno o más polipéptidos codificados por una o más secuencias de ácido nucleico contiguas desveladas en la presente solicitud, o para fragmentos activos, o para variantes de los mismos, o para una o más secuencias de ácido nucleico que hibridan con una o más de estas secuencias en condiciones de rigurosidad moderada a alta.

Como se usa en el presente documento, un fragmento activo de un polipéptido incluye una parte o el total de un polipéptido que se modifica por técnicas convencionales, por ejemplo, mutagénesis, o por la adición, delección o sustitución, pero cuyo fragmento activo muestra sustancialmente la misma función estructural, antigenicidad, etc., que un polipéptido como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones ilustrativas, los polipéptidos de la invención comprenderán al menos una parte inmunogénica de una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico o una variante de la misma, como se describe en el presente documento. Como se ha indicado anteriormente, una "proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico" es una proteína que se expresa por células tumorales relacionadas con tumor maligno hematológico. Las proteínas que son proteínas tumorales relacionadas con tumor maligno hematológico también reaccionan de forma detectable dentro de un inmunoensayo (tal como un ELISA) con antisuero de un paciente con tumor maligno hematológico. Los polipéptidos como se describen en el presente documento pueden ser de cualquier longitud. Pueden estar presentes secuencias adicionales derivadas de la proteína nativa y/o secuencias heterólogas y tales secuencias pueden (pero no necesitan) poseer propiedades inmunogénicas o antigénicas adicionales.

Una "parte inmunogénica" como se usa en el presente documento es una parte de una proteína que se reconoce (es decir, se une específicamente) por un receptor de antígeno de superficie de linfocitos B y/o linfocitos T. Tales partes inmunogénicas generalmente comprenden al menos 5 restos aminoacídicos, mas preferentemente al menos 10 y aún más preferentemente al menos 20 restos aminoacídicos de una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico o una variante de la misma. Ciertas partes inmunogénicas preferidas incluyen péptidos en los que se ha suprimido una secuencia líder N-terminal y/o dominio transmembrana. Otras partes inmunogénicas preferidas pueden contener una delección pequeña N y/o C-terminal (por ejemplo, 1-30 aminoácidos, preferentemente 5-10 aminoácidos), en relación con la proteína madura.

Las partes inmunogénicas pueden generalmente identificarse usando técnicas bien conocidas tales como las resumidas en Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª ed., 243-247 (Raven Press, 1993) y referencias citadas en la misma. Tales técnicas incluyen explorar polipéptidos con respecto a la capacidad para reaccionar con anticuerpos específicos de antígeno, antisueros y/o líneas de linfocitos T o clones. Como se usa en el presente documento, los antisueros y anticuerpos son "específicos de antígeno" si se unen específicamente a un antígeno (es decir, reaccionan con la proteína en un ELISA u otro inmunoensayo y no reaccionan de forma detectable con proteínas no relacionadas). Tales antisueros y anticuerpos pueden prepararse como se describe en el presente documento y usando técnicas bien conocidas. Una parte inmunogénica de una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico nativa es una parte que reacciona con tales antisueros y/o linfocitos T en un nivel que no es sustancialmente menor que la reactividad del polipéptido de longitud completa (por ejemplo, en un ensayo de reactividad de linfocitos T y/o ELISA). Tales partes inmunogénicas pueden reaccionar dentro de tales ensayos a un nivel que es similar a o mayor que la reactividad del polipéptido de longitud completa. Tales exploraciones pueden realizarse generalmente usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, tales como los descritos en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Por ejemplo, puede inmovilizarse un polipéptido en un soporte sólido y ponerse en contacto con suero de pacientes para permitir la unión de anticuerpos dentro del suero con el polipéptido inmovilizado. Los sueros no unidos pueden después retirarse y los anticuerpos unidos detectarse usando, por ejemplo, proteína A marcada con <sup>125</sup>I.

Como se ha observado anteriormente, una composición puede comprender una variante de una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico nativa. Una "variante" polipeptídica, como se usa en el presente documento, es un polipéptido que difiere de una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico nativa en una o más sustituciones, delecciones, adiciones y/o inserciones, de modo que la inmunogenicidad del polipéptido no se disminuye sustancialmente. En otras palabras, la capacidad de una variante para reaccionar con antisueros específicos de antígeno puede potenciarse o no cambiar, en relación con la proteína nativa, o puede disminuirse en menos del 50 % y preferentemente menos del 20 %, en relación con la proteína nativa. Tales variantes pueden generalmente identificarse modificando una de las secuencias polipeptídicas anteriores y evaluando la reactividad del polipéptido modificado con anticuerpos específicos de antígeno o antisueros como se describe en el presente documento. Las variantes preferidas incluyen en las que una o más partes, tales como una secuencia líder N-terminal o el dominio transmembrana, se han retirado. Otras variantes preferidas incluyen variantes en las que una parte pequeña (por ejemplo, 1-30 aminoácidos, preferentemente 5-15 aminoácidos) se ha retirado del extremo N y/o C-terminal de la proteína madura.

Las variantes polipeptídicas abarcadas por la presente invención incluyen las que muestran al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más identidad (determinada como se ha descrito anteriormente) con los polipéptidos desvelados en el presente documento.

Preferentemente, una variante contiene sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una en la que un aminoácido sustituye a otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la materia de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido se mantenga sustancialmente sin cambios. Pueden hacerse generalmente sustituciones de aminoácidos basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos funcionales polares no cargados que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante puede también, o como alternativa, contener cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia nativa por sustitución, delección o adición de cinco aminoácidos o menos. Las variantes pueden también (o como alternativa) modificarse por, por ejemplo, la delección o adición de aminoácidos que tienen influencia mínima en la inmunogenicidad, estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido.

Como se ha observado anteriormente, los polipéptidos pueden comprender una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína, que dirige de forma co-traduccional o post-traduccional la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede conjugarse con un engarce u otra secuencia para facilitar de síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His) o para potenciar la unión del polipéptido con un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una región Fc de inmunoglobulina.

Pueden prepararse polipéptidos usando cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas. Pueden prepararse fácilmente polipéptidos recombinantes codificados por secuencias de ADN como se ha descrito anteriormente a partir de las secuencias de ADN usando cualquiera de una diversidad de vectores de expresión conocidos por los expertos en la materia. La expresión puede conseguirse en cualquier célula huésped apropiada que se ha transformado o transfectado con un vector de expresión que contiene una molécula de ADN que codifica un polipéptido recombinante. Las células huésped adecuadas incluyen procariontas, levadura y células eucariotas superiores, tales como células de mamífero y células vegetales. Preferentemente, las células huésped empleadas son *E. coli*, levadura o una línea celular de mamífero tal como COS o CHO. Los sobrenadantes de sistemas de vector/huésped adecuados que secretan proteína recombinante o polipéptido en medio de cultivo pueden concentrarse primero usando un filtro disponible en el mercado. Después de la concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada tal como una matriz de afinidad o una resina de intercambio iónico. Finalmente, puede emplearse una o más etapas de HPLC de fase inversa para purificar adicionalmente un polipéptido recombinante.

También pueden generarse partes y otras variantes que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos y generalmente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, tales polipéptidos pueden sintetizarse usando cualquiera de las técnicas de fase sólida disponibles en el mercado, tales como el procedimiento de síntesis de fase sólida de Merrifield, en el que se añaden secuencialmente aminoácidos a una cadena de aminoácidos creciente. Véase Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963. El equipamiento para síntesis automática de polipéptidos está disponible en el mercado de proveedores tales como Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, CA), y pueden operarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dentro de ciertas realizaciones específicas, un polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende múltiples polipéptidos como se describe en el presente documento o que comprende al menos un polipéptido como se describe en el presente documento y una secuencia no relacionada, tal como una proteína tumoral conocida. Un compañero de fusión puede, por ejemplo, ayudar para proporcionar epítopos auxiliares T (un compañero de fusión inmunológico), preferentemente epítopos auxiliares T reconocidos por seres humanos o pueden ayudar en la expresión de la proteína (un potenciador de la expresión) a mayores rendimientos que la proteína recombinante nativa. Ciertos compañeros de fusión preferidos son compañeros de fusión tanto potenciadores de la expresión como inmunológicos. Pueden seleccionarse otros compañeros de fusión para aumentar la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se dirija a compartimentos intracelulares deseados. Otros compañeros de fusión adicionales incluyen marcadores de afinidad, que facilitan la purificación de la proteína.

Las proteínas de fusión pueden generalmente prepararse usando técnicas convencionales, incluyendo conjugación química. Preferentemente, una proteína de fusión se expresa como una proteína recombinante, permitiendo la producción de niveles aumentados, en relación con una proteína no fusionada, en un sistema de expresión. Brevemente, pueden ensamblarse secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos de forma separada y ligarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico se liga, con o sin un engarce polipeptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico de modo que las fases de lectura de las secuencias están en fase. Esto permite la traducción en una proteína de fusión sencilla que conserva la actividad biológica de ambos componentes polipeptídicos.

Puede emplearse una secuencia de engarce peptídica para separar el primer y segundo componentes polipeptídicos



- por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y terciaria. Dicha secuencia de engarce peptídico se incorpora en la proteína de fusión usando técnicas convencionales bien conocidas en la materia. Las secuencias de engarce peptídico adecuadas pueden seleccionarse basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptidos y (3) la falta de restos cargados o hidrófobos que podrían reaccionar con los epítomos funcionales polipeptídicos. Las secuencias de engarce peptídico preferidas contienen restos de Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos neutros cercanos, tales como Thr y Ala también pueden usarse en la secuencia de engarce. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de forma útil como engarces incluyen las desveladas en Maratea y col., Gene 40:39-46, 1985; Murphy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; Patente de Estados Unidos N° 4.935.233 y Patente de Estados Unidos N° 4.751.180. La secuencia de engarce puede generalmente ser de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Las secuencias de engarce no se requieren cuando el primer y segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y evitar la interferencia estérica.
- Las secuencias de ADN ligadas se unen operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión de ADN se localizan solamente 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De forma similar, los codones de parada requeridos para terminar la traducción y las señales de terminación de la transcripción solo están presentes 3' de la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.
- También se proporcionan proteínas de fusión. Tales proteínas comprenden un polipéptido como se describe en el presente documento junto con una proteína inmunogénica no relacionada. Preferentemente, la proteína inmunogénica es capaz de inducir una respuesta de reclutamiento. Los ejemplos de tales proteínas incluyen proteínas del tétanos, tuberculosis y hepatitis (véase, por ejemplo, Stoute y col. New Engl. J. Med., 336:86-91,1997).
- Dentro de las realizaciones preferidas, un compañero de fusión inmunológico se deriva de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gram-negativa *Haemophilus influenza* B (documento WO 91/18926). Preferentemente, un derivado de proteína D comprende aproximadamente el primer tercio de la proteína (por ejemplo, los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales) y un derivado de proteína D puede estar lipidado. Dentro de ciertas realizaciones preferidas, los primeros 109 restos de un compañero de fusión de lipoproteína D se incluye en el extremo N-terminal para proporcionar al polipéptido epítomos de linfocitos T exógenos adicionales y para aumentar el nivel de expresión en *E. coli* (actuando de este modo como un potenciador de la expresión). La cola lipídica asegura una presentación óptima del antígeno a células presentadoras de antígeno. Otros compañeros de fusión incluyen la proteína no estructural del virus de la gripe, NS 1 (hemaglutinina). Típicamente, se usan los 81 aminoácidos N-terminales, aunque pueden usarse diferentes fragmentos que incluyen epítomos auxiliares T.
- En otra realización, el compañero de fusión inmunológico es la proteína conocida como LYTA o una parte de la misma (preferentemente una parte C-terminal). LYTA deriva de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa conocida como amidasa LYTA (codificada por el gen *LytA*; Gene 43:265-292, 1986). LYTA es una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en la cadena principal de peptidoglucano. El dominio C-terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad con la colina o con algunos análogos de colina tales como DEAE. Esta propiedad se ha explotado para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LYTA de *E. coli* útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA en el extremo amino terminal (véase *Biotechnology* 10:795-798, 1992). Dentro de una realización preferida, puede incorporarse una parte de repetición de LYTA en una proteína de fusión. Una parte de repetición se encuentra en la región C-terminal que comienza en el resto 178. Una parte de repetición particularmente preferida incorpora los restos 188-305.
- En general, los polipéptidos (incluyendo proteínas de fusión) y polinucleótidos como se describe en el presente documento están aislados. Un polipéptido o polinucleótido "aislado" es uno que se retira de su ambiente original. Por ejemplo, una proteína de origen natural está aislada si está separada de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferentemente, tales polipéptidos son al menos aproximadamente 90 % puros, más preferentemente al menos aproximadamente 95 % puros y más preferentemente al menos aproximadamente 99 % puros. Se considera que un polinucleótido está aislado si, por ejemplo, se clona en un vector que no es parte del ambiente natural.

#### 4.20 Agentes de unión

- La presente invención emplea adicionalmente agentes, tales como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a un antígeno relacionado con tumor maligno hematológico. Como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se "une específicamente" a un antígeno relacionado con tumor maligno hematológico si reacciona a un nivel detectable (dentro de, por ejemplo, un ELISA) con, y no reacciona de forma detectable con proteínas no relacionadas en condiciones similares. Como se usa en el presente documento, "unión" se refiere a una asociación no covalente entre dos moléculas separadas de modo que se forma un complejo. La capacidad para unirse puede evaluarse por, por ejemplo, la determinación de una constante de unión para la formación del complejo. La constante de unión es el

valor obtenido cuando la concentración del complejo se divide por el producto de las concentraciones de los componentes. En general, se dice que dos compuestos se “unen”, en el contexto de la presente invención, cuando la constante de unión para la formación de complejo excede aproximadamente  $10^3$  l/mol. La constante de unión puede determinarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

- 5 Los agentes de unión pueden además ser capaces de diferenciar entre pacientes con y sin un tumor maligno hematológico. Tales agentes de unión generan una señal que indica la presencia de un tumor maligno hematológico en al menos aproximadamente el 20 % de los pacientes con la enfermedad y generarán una señal negativa que indica la ausencia de la enfermedad en al menos aproximadamente el 90 % de los individuos con la enfermedad. Para determinar si un agente de unión satisface este requisito, pueden ensayarse muestras biológicas (por ejemplo, sangre, suero, orina y/o biopsias tumorales) de pacientes con y sin un tumor maligno hematológico (según se determine usando ensayos clínicos convencionales) como se describe en el presente documento con respecto a la presencia de polipéptidos que se unen al agente de unión. Resultará evidente que debería ensayarse un número estadísticamente significativo de muestras con y sin la enfermedad. Cada agente de unión debería satisfacer los criterios anteriores; sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que pueden usarse agentes de unión en combinación para mejorar la sensibilidad.

20 Cualquier agente que satisfaga los requisitos anteriores puede ser un agente de unión. Por ejemplo, un agente de unión puede ser un ribosoma, con o sin un componente peptídico, una molécula de ARN o un polipéptido. En una realización preferida, un agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos pueden prepararse por cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En general, pueden producirse anticuerpos por técnicas de cultivo celular, incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales como se describen en el presente documento, o mediante la transfección de genes de anticuerpos en huéspedes de células de mamífero o bacterianas adecuados, para permitir la producción de anticuerpos recombinantes. En una técnica, se inyecta inicialmente un inmunógeno que comprende el polipéptido en cualquiera de una amplia diversidad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas o cabras). En esta etapa, los polipéptidos de la presente invención pueden actuar como el inmunógeno sin modificación. Como alternativa, particularmente para polipéptidos relativamente cortos, puede inducirse una respuesta inmune superior si el polipéptido se une a una proteína vehículo, tal como albúmina de suero bovino o hemocianina de lapa californiana. El inmunógeno se inyecta en el huésped animal, preferentemente de acuerdo con un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo y se toman muestras sanguíneas de los animales periódicamente. Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido pueden después purificarse a partir de tales antisueros mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

35 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido antigénico de interés, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, y mejoras de la misma. Brevemente, estos procedimientos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de interés). Tales líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, a partir de células de bazo obtenidas de un animal inmunizado como se ha descrito anteriormente: las células de bazo se immortalizan después por, por ejemplo, fusión con un compañero de fusión de célula de mieloma, preferentemente uno que es singénico con el animal inmunizado. Puede emplearse una diversidad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células de bazo y células de mieloma pueden combinarse con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y después sembrarse en placas a baja densidad en un medio selectivo que soporta el crecimiento de células híbridas, pero no células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa selección de HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, habitualmente de aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias sencillas y se ensayan sus sobrenadantes de cultivo con respecto a actividad de unión frente al polipéptido. Se prefieren hibridomas que tengan alta reactividad y especificidad.

50 Pueden aislarse anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de colonias de hibridoma crecientes. Además, pueden emplearse diversas técnicas para potenciar el rendimiento, tal como inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales pueden después recogerse del fluido ascítico o la sangre. Pueden retirarse los contaminantes de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Los polipéptidos de la presente invención pueden usarse en el procedimiento de purificación en, por ejemplo, una etapa de cromatografía de afinidad.

55 Dentro de ciertas realizaciones, pueden preferirse el uso de fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fab, que pueden prepararse usando técnicas convencionales. Brevemente, pueden purificarse inmunoglobulinas de suero de conejo por cromatografía de afinidad en columnas de perlas de proteína A (Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) y digerirse por papaína para producir fragmentos Fab y Fc. Los fragmentos Fab y Fc pueden separarse por cromatografía de afinidad en columnas de perlas de proteína A.

60 Pueden acoplarse anticuerpos monoclonales, y fragmentos de los mismos, de la presente invención a uno o más agentes terapéuticos, tales como radionúclidos, inductores de diferenciación, fármacos, toxinas y derivados de los

mismos. Los radionúclidos preferidos incluyen  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$  y  $^{212}\text{Bi}$ . Los fármacos preferidos incluyen metotrexato y análogos de pirimidina y purina. Los inductores de diferenciación preferidos incluyen ésteres de forbol y ácido butírico. Las toxinas preferidas incluyen ricina, abrina, toxina de difteria, toxina del cólera, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de *Shigella* y proteína antiviral de *Phytolacca americana*. Para ciertas terapias *in vivo* y *ex vivo*, un anticuerpo o fragmento del mismo se acopla preferentemente a un agente citotóxico, tal como un resto radiactivo o quimioterapéutico.

Un agente terapéutico puede acoplarse (por ejemplo, unirse covalentemente) a un anticuerpo monoclonal adecuado directa o indirectamente (por ejemplo, mediante un grupo de engarce). Es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Como alternativa, puede ser deseable acoplar un agente terapéutico y un anticuerpo mediante un grupo de engarce. Un grupo de engarce puede actuar como un espaciador para distanciar un anticuerpo de un agente para evitar interferencias con las capacidades de unión. Un grupo de engarce también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente o un anticuerpo y de este modo aumentar la eficacia de acoplamiento. Un aumento de la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes o grupos funcionales en agentes, que de otro modo no sería posible.

Resultará evidente para los expertos en la materia que puede emplearse una diversidad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo como heterofuncionales (tales como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, IL) como el grupo de engarce. El acoplamiento puede efectuarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o restos de carbohidratos oxidados. Existen numerosas referencias que describen dicha metodología, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.671.958.

Cuando el agente terapéutico es más potente sin la parte de anticuerpo de los inmunoconjugados de la presente invención, puede ser deseable usar un grupo de engarce que sea escindible durante o tras la internalización en una célula. Se han descrito varios grupos de engarce escindibles diferentes. Los mecanismos de la liberación intracelular de un agente de estos grupos de engarce incluyen escisión por reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.489.710), por irradiación de un enlace fotolábil (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.625.014), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivatizadas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.638.045), por hidrólisis mediada por complemento en suero (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.671.958) e hidrólisis catalizada por ácido (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.569.789).

Puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo. En una realización, se acoplan múltiples moléculas de un agente a una molécula de anticuerpo. En otra realización, puede acoplarse más de un tipo de agente a un anticuerpo. Independientemente de la realización particular, pueden prepararse inmunoconjugados con más de un agente de una diversidad de maneras. Por ejemplo, puede acoplarse más de un agente directamente a una molécula de anticuerpo o pueden usarse engarces que proporcionen múltiples sitios para unión. Como alternativa, puede usarse un vehículo.

Un vehículo puede portar los agentes de una diversidad de maneras, incluyendo enlace covalente directamente o mediante un grupo de engarce. Los vehículos adecuados incluyen proteínas tales como albúminas (por ejemplo Patente de Estados Unidos N° 4.507.234), péptidos y polisacáridos tales como aminodextrano (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.699.784). Un vehículo también puede portar un agente por enlace no covalente o por encapsulación, tal como dentro de una vesícula de liposoma (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.429.008 y 4.873.088). Los vehículos específicos para agentes radionúclidos incluyen moléculas pequeñas radiohalogenadas y compuestos quelantes. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.735.792 desvela moléculas pequeñas radiohalogenadas representativas y su síntesis. Puede formarse un quelado de radionúclido a partir de compuestos quelantes que incluyen los que contienen átomos de nitrógeno y azufre como los átomos donadores para unir el radionúclido metálico o de óxido metálico. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.673.562 desvela compuestos quelantes representativos y su síntesis.

Pueden usarse una diversidad de rutas de administración para los anticuerpos e inmunoconjugados. Típicamente, la administración será intravenosa, intramuscular, subcutánea o en el lecho de un tumor reseado. Resultará evidente que la dosis precisa del anticuerpo/inmunoconjugado variará dependiendo del anticuerpo usado, la densidad del antígeno en el tumor y la tasa de eliminación del anticuerpo.

#### 4.21 Vacunas

En ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, se proporcionan vacunas. Las vacunas generalmente comprenderán una o más composiciones farmacéuticas tales como las analizadas anteriormente, en combinación con un inmunoestimulador. Un inmunoestimulador puede ser cualquier sustancia que potencie o mejore una respuesta inmune (mediada por anticuerpos y/o células) a un antígeno exógeno. Los ejemplos de inmunoestimuladores incluyen adyuvantes, microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica) y

liposomas (en los que se incorpora el compuesto; véase por ejemplo, Fullerton, Patente de Estados Unidos N° 4.235.877). La preparación de vacuna se describe de forma general en, por ejemplo, M.F. Powell y M.J. Newman, eds., "Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)," Plenum Press (NY, 1995). Las composiciones farmacéuticas y vacunas dentro del alcance de la presente invención también pueden contener otros compuestos, que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Por ejemplo, puede estar presente una o más partes inmunogénicas de otros antígenos tumorales, incorporadas en un polipéptido de fusión o como un compuesto separado, dentro de la composición o vacuna.

Las vacunas ilustrativas pueden contener ADN que codifica uno o más de los polipéptidos como se ha descrito anteriormente, de modo que el polipéptido se genere *in situ*. Como se ha observado anteriormente, el ADN puede estar presente dentro de cualquiera de una diversidad de sistemas de suministro conocidos por los expertos en la materia, incluyendo sistemas de expresión de ácido nucleico, sistemas de expresión bacterianos y virales. Se conocen bien en la materia numerosas técnicas de suministro de genes, tales como las descritas por Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, 1998, y referencias citadas en la misma. Los sistemas de expresión de ácidos nucleicos apropiados contienen las secuencias de ADN necesarias para expresión en el paciente (tales como un promotor adecuado y señal de terminación). Los sistemas de suministro bacteriano implican la administración de una bacteria (tal como Bacilo de Calmette-Guerrin) que expresa una parte inmunogénica del polipéptido en su superficie celular o secreta un epítipo tal. En una realización preferida, el ADN puede introducirse usando un sistema de expresión viral (por ejemplo, vaccinia u otro pox virus, retrovirus o adenovirus), que puede implicar el uso de un virus competente para replicación no patogénico (defectivo). Se desvelan sistemas adecuados, por ejemplo, en Fisher-Hoch y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321, 1989; Flexner y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989; Flexner y col., Vaccine 8: 17-21, 1990; Patentes de Estados Unidos N° 4.603.112, 4.769.330 y 5.017.487; documento WO 89/01973; Patente de Estados Unidos N° 4.777.127; documento Gob 2.200.651; documento EP 0.345.242; documento WO 91/02805; Berkner, Biotechniques 6: 616-627, 1988; Rosenfeld y col., Science 252:431-434, 1991; Kolls y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 215-219, 1994; Kass-Eisler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502, 1993; Guzman y col., Circulation 88: 2838-2848, 1993; y Guzman y col., Cir. Res. 73:1202-1207, 1993. Se conocen bien por los expertos en la materia técnicas para incorporar ADN en tales sistemas de expresión. El ADN también puede estar "desnudo", como se describe, por ejemplo, en Ulmer y col., Science 259: 1745-1749, 1993 y se revisa en Cohen, Science 259: 1691-1692, 1993. La captación de ADN desnudo puede aumentarse revistiendo perlas biodegradables con el ADN, que se transportan eficazmente a las células. Resultará evidente que una vacuna puede comprender un componente tanto como polinucleotídico como polipeptídico. Tales vacunas pueden proporcionar una respuesta inmune potenciada.

Resultará evidente que una vacuna puede contener sales farmacéuticamente aceptables de los polinucleótidos y polipéptidos proporcionados en el presente documento. Tales sales pueden prepararse a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases orgánicas (por ejemplo, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias y aminoácidos básicos) y bases inorgánicas (por ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio).

Aunque puede emplearse cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la materia en las composiciones de vacuna de la presente invención, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Las composiciones de la presente invención pueden formularse para cualquier manera apropiada de administración, incluyendo, por ejemplo, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo preferentemente comprende agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para administración oral, pueden emplearse cualquiera de los vehículos anteriores o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Las microesferas biodegradables (por ejemplo, poliglicolato de polilactato) también pueden emplearse como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Se desvelan microesferas biodegradables adecuadas, por ejemplo, en las Patente de Estados Unidos N° 4.897.268; 5.075.109; 5.928.647; 5.811.128; 5.820.883; 5.853.763; 5.814.344 y 5.942.252. También puede emplearse un vehículo que comprende los complejos de proteínas particuladas descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.928.647, que son capaces de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos restringida a clase I en un huésped.

Tales composiciones también pueden comprender tampones (por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostatos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio), solutos que hacen a la formulación isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes. Como alternativa, pueden formularse composiciones de la presente invención como un liofilizado. Los compuestos también pueden encapsularse dentro de liposomas usando tecnología bien conocida.

Puede emplearse cualquiera de una diversidad de inmunoestimuladores en las vacunas de la presente invención. Por ejemplo, puede incluirse un adyuvante. La mayoría de los adyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno de catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral y un estimulador de respuestas inmunes, tal como lípido A, proteínas derivadas de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Están disponibles adyuvantes adecuados en el mercado como, por ejemplo, adyuvante incompleto y adyuvante

completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI); adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Filadelfia, PA); sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de citosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivatizados catiónica o aniónicamente; polifosfacenos; microesferas biodegradables; monofosforilo lípido A y quil A. también puede usarse citocinas, tales como GM-CSF o interleucina 2, 7 o 12 como adyuvantes.

Dentro de las vacunas proporcionadas en el presente documento, la composición adyuvante se diseña preferentemente para inducir una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Los altos niveles de citocinas de tipo Th1 (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 y IL-12) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno administrado. Por el contrario, los altos niveles de citocinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales. Tras la aplicación de una vacuna como se proporciona en el presente documento, un paciente soportará una respuesta inmune que incluye respuestas de tipo Th1 y Th2. Dentro de una realización preferida, en la que una respuesta es predominantemente de tipo Th1, el nivel de citocinas de tipo Th1 aumentará en una mayor medida que el nivel de las citocinas de tipo Th2. Los niveles de estas citocinas pueden evaluarse fácilmente usando ensayos convencionales. Para una revisión de las familias de citocinas, véase Mosmann y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173, 1989.

Los adyuvantes preferidos para su uso en la inducción de una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), junto con una sal de aluminio. Están disponibles adyuvantes de MPL de Corixa Corporation (Seattle, WA; véase Patentes de Estados Unidos N° 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4,912,094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta predominantemente Th1. Tales oligonucleótidos se conocen bien y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y las Patentes de Estados Unidos N° 6.008.200 y 5.856.462. También se describen secuencias de ADN inmunoestimuladoras, por ejemplo, por Sato y col., Science 273:352, 1996. Otro adyuvante preferido es una saponina, preferentemente QS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA), que puede usarse sola o en combinación con otros adyuvantes. Por ejemplo, un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil lípido A y derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en documento WO 94/00153 o una composición menos reactogénica en la que la QS21 está inactivada con colesterol, como se describe en el documento WO 96/33739. Otras formulaciones preferidas comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95117210.

Otros adyuvantes preferidos incluyen Montanide ISA 720 (Seppic, Francia), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie SBAS de adyuvantes (por ejemplo, SBAS-2 o SBAS-4, disponibles de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Detox (Corixa, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) y otros aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGP), tales como las descritas en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Pendientes con N° de serie 08/853.826 y 09/074.720, las divulgaciones de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Cualquier vacuna proporcionada en el presente documento puede prepararse usando procedimientos bien conocidos que dan como resultado una combinación de antígeno, potenciador de respuesta inmune y un vehículo o excipiente adecuado. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse como parte de una formulación de liberación prolongada (es decir, una formulación tal como una cápsula, esponja o gel (compuesta de polisacáridos, por ejemplo) que efectúa una liberación lenta del compuesto después de la administración). Tales formulaciones pueden generalmente prepararse usando tecnología bien conocida (véase, por ejemplo, Coombes y col., Vaccine 14:1429-1438, 1996) y administrarse por, por ejemplo, implantación oral, rectal o subcutánea o por implantación en el sitio diana deseado. Las formulaciones de liberación prolongada pueden contener un polipéptido, polinucleótido o anticuerpo dispersado en una matriz de vehículo y/o contenido dentro de un depósito rodeado por una membrana controladora de la velocidad.

Los vehículos para su uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferentemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación de componente activo. Tales vehículos incluyen micropartículas de poli(lactida-co-glicolida), poliacrilato, látex, almidón, celulosa, dextrano y similares. Otros vehículos de liberación retardada incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un núcleo hidrófilo no líquido (por ejemplo, un polisacárido u oligosacárido reticulado) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifílico, tal como un fosfolípido (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.151.254 y solicitudes de PCT WO 94/20078, WO/94/23701 y WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenida dentro de una formulación de liberación prolongada depende del sitio de implantación, la tasa y duración esperada de liberación y la naturaleza de la afección a tratar o prevenir.

Puede emplearse cualquiera de una diversidad de vehículos de suministro dentro de composiciones farmacéuticas y vacunas para facilitar la producción de una respuesta inmune específica de antígeno que se dirige a células tumorales. Los vehículos de suministro incluyen células presentadoras de antígeno (APC), tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, monocitos y otras células que pueden modificarse por ingeniería genética para ser APC eficaces. Tales células pueden, pero no necesitan, modificarse genéticamente para aumentar la capacidad

para presentar el antígeno, para mejorar la activación y/o el mantenimiento de la respuesta de linfocitos T, para tener efectos antitumorales por sí mismas y/o para ser inmunológicamente compatibles con el receptor (es decir haplotipo de HLA coincidente). Las APC pueden generalmente aislarse de cualquiera de una diversidad de fluidos y órganos biológicos, incluyendo tejidos tumorales y peritumorales, y pueden ser células autólogas, alogénicas, singénicas o xenogénicas.

Ciertas realizaciones preferidas de la presente invención usan células dendríticas o progenitoras de las mismas como células presentadoras de antígenos. Las células dendríticas son APC altamente potentes (Banchereau y Steinman, Nature 392:245-251, 1998) y han mostrado que son eficaces como un adyuvante fisiológico para inducir inmunidad antitumoral profiláctica o terapéutica (véase, Timmerman y Levy, Ann. Rev. Med. 50:507-529, 1999). En general, pueden identificarse células dendríticas basándose en su forma típica (*in situ* estrellada, con protuberancias citoplasmáticas notables (dendritas) visibles *in vitro*), su capacidad para captar, procesar y presentar antígenos con alta eficacia y su capacidad para activar respuestas de linfocitos T vírgenes. Las células dendríticas pueden, por supuesto, modificarse por ingeniería genética para expresar receptores o ligandos de superficie celular específicos que no se hayan habitualmente en células dendríticas *in vivo* o *ex vivo* y tales células dendríticas modificadas se contemplan por la presente invención. Como una alternativa a células dendríticas, pueden usarse células dendríticas cargadas con antígenos de vesículas secretadas (llamadas exosomas) dentro de una vacuna (véase Zitvogel y col., Nature Med. 4:594-600,1998).

Pueden obtenerse células dendríticas y progenitoras de sangre periférica, médula ósea, células que se infiltran en tumores, células que se infiltran en tejidos peritumorales, ganglios linfáticos, bazo, piel, sangre del cordón umbilical u otro tejido o fluido adecuado. Por ejemplo, pueden diferenciarse células dendríticas *ex vivo* añadiendo una combinación de citocinas tales como GM-CSF, IL-4, IL-13 y/o TNF $\alpha$  a cultivos de monocitos recogidos de sangre periférica. Como alternativa, pueden diferenciarse células positivas para CD34 recogidas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea en células dendríticas añadiendo al medio de cultivo combinaciones de GM-CSF, IL-3, TNF $\alpha$ , ligando CD40, LPS, ligando flt3 y/u otro compuesto o compuestos que inducen diferenciación, maduración y proliferación de células dendríticas.

Las células dendríticas se categorizan convenientemente como células "inmaduras" y "maduras", lo que permite una forma simple de diferenciar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, no debe interpretarse que esta nomenclatura excluye todas las etapas intermedias posibles de diferenciación. Se caracterizan células dendríticas inmaduras como APC con alta capacidad para captación de antígenos y procesamiento, que se correlaciona con la alta expresión de receptor de Fc $\gamma$  y receptor de manosa. El fenotipo maduro se caracteriza típicamente por una expresión menor de estos marcadores, pero una alta expresión de moléculas de superficie celular responsable de la activación de linfocitos T tales como MHC de clase I y clase II, moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54 y CD11) y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD40, CD80, CD86 y 4-1BB).

Las APC pueden generalmente transfectarse con un polinucleótido que codifica una proteína tumoral relacionada con un tumor maligno hematológico (o parte u otra variante de la misma) de modo que el polipéptido tumoral relacionado con tumor maligno hematológico, o una parte inmunogénica del mismo, se expresa en la superficie celular. Dicha transfección puede tener lugar *ex vivo* y puede usarse después una composición o vacuna que comprenda tales células transfectadas para fines terapéuticos, como se describe en el presente documento. Como alternativa, puede administrarse un vehículo de suministro génico que se dirige a una célula dendrítica u otra presentadora de antígenos a un paciente, dando como resultado transfección que se produce *in vivo*. La transfección *in vivo* y *ex vivo* de células dendríticas, por ejemplo, puede generalmente realizarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 97/24447 o el enfoque de pistola génica descrito por Mahvi y col., Immunology and cell Biology 75:456-460, 1997. Puede conseguirse carga antigénica de las células dendríticas incubando células dendríticas o células progenitoras con el polipéptido tumoral relacionado con tumor maligno hematológico, ADN (desnudo o dentro de un vector plasmídico) o ARN; o con bacteria o virus recombinante que expresa el antígeno (por ejemplo, vectores de vaccinia, viruela aviar, adenovirus o lentivirus). Antes de la carga, el polipéptido puede conjugarse covalentemente con un compañero inmunológico que proporciona ayuda a los linfocitos T (por ejemplo, una molécula vehículo). Como alternativa, una célula dendrítica puede pulsarse con un compañero inmunológico no conjugado, de forma separada o en presencia del polipéptido.

Las vacunas y composiciones farmacéuticas pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o multidosis, tales como ampollas selladas o viales. Tales recipientes están preferentemente sellados herméticamente para conservar la esterilidad de la formulación hasta su uso. En general, pueden almacenarse formulaciones como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. Como alternativa, puede almacenarse una composición farmacéutica o vacuna en una condición liofilizada que requiere solamente la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

#### 4. 22 Terapia de cáncer

En aspectos adicionales de la presente invención las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para inmunoterapia de cáncer, tal como tumor maligno hematológico. Dentro de tales procedimientos, se administran típicamente composiciones farmacéuticas y vacunas a un paciente. Como se usa en el presente documento, un "paciente" se refiere a cualquier animal de sangre caliente, preferentemente un ser humano. Un

paciente puede o no estar aquejado de cáncer. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas y vacunas anteriores pueden usarse para evitar el desarrollo de un cáncer o para tratar a un paciente aquejado de cáncer. Puede diagnosticarse un cáncer usando criterios generalmente aceptados en la técnica, incluyendo la presencia de un tumor maligno. Las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden administrarse antes o después de la retirada quirúrgica de tumores primarios y/o tratamiento tal como la administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales. La administración puede ser por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo administración por vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica, anal, vaginal, tópica y oral.

Dentro de ciertas realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia activa, en la que el tratamiento se basa en la estimulación *in vivo* del sistema inmune del huésped endógeno para reaccionar contra tumores con la administración de agentes modificadores de respuesta inmune (tales como polipéptidos y polinucleótidos como se proporcionan en el presente documento).

Dentro de otras realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia pasiva, en la que el tratamiento implica el suministro de agentes con reactividad inmune para tumores establecidos (tales como células efectoras o anticuerpos) que pueden mediar directa o indirectamente los efectos antitumorales y no dependen necesariamente de un sistema inmune del huésped intacto. Los ejemplos de células efectoras incluyen linfocitos T como se ha analizado anteriormente, linfocitos T (tales como linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> y linfocitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> que se infiltran en tumores), linfocitos citolíticos (tales como linfocitos citolíticos naturales y linfocitos citolíticos activados por linfocina), linfocitos B y células presentadoras de antígenos (tales como células dendríticas y macrófagos) que expresan un polipéptido proporcionado en el presente documento. Los receptores de linfocitos T y receptores de anticuerpos específicos para los polipéptidos enumerados en el presente documento pueden clonarse, expresarse y transferirse a otros vectores o células efectoras para inmunoterapia adoptiva. Los polipéptidos proporcionados en el presente documento también pueden usarse para generar anticuerpos o anticuerpos anti-idiotípicos (como se ha descrito anteriormente y en la Patente de Estados Unidos N° 4.918.164) para inmunoterapia pasiva.

Pueden obtenerse generalmente células efectoras en cantidades suficientes para inmunoterapia adoptiva mediante crecimiento *in vitro*, como se ha descrito en el presente documento. Se conocen bien en la técnica condiciones de cultivo para expandir células efectoras específicas de antígeno sencillas hasta varios miles de millones en número con retención de reconocimiento de antígenos *in vivo*. Tales condiciones de cultivo *in vitro* típicamente usan estimulación intermitente con antígeno, con frecuencia en presencia de citocinas (tales como IL-2) y células alimentadoras no en división. Como se ha observado anteriormente, pueden usarse polipéptidos inmunorreactivos como se proporciona en el presente documento para expandir rápidamente cultivos de linfocitos T específicos de antígeno para generar un número suficiente de células para inmunoterapia. En particular, las células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, macrófagos, monocitos, fibroblastos y/o linfocitos B, pueden pulsarse con polipéptidos inmunorreactivos o transfectarse con un uno o más polinucleótidos usando técnicas convencionales bien conocidas en la materia. Por ejemplo, pueden transfectarse células presentadoras de antígenos con un polinucleótido que tiene un promotor apropiado para aumentar la expresión en un virus recombinante u otro sistema de expresión. Las células efectoras cultivadas para su uso en terapia deben ser capaces de crecer y distribuirse ampliamente y de sobrevivir a largo plazo *in vivo*. Los estudios han mostrado que puede inducirse a las células efectoras cultivadas a crecer *in vivo* y a sobrevivir a largo plazo en números sustanciales por estimulación repetida con antígeno complementado con IL-2 (véase, por ejemplo, Cheever y col., Immunological Reviews 157:177,1997).

Como alternativa, puede introducirse un vector que expresa un polipéptido enumerado en el presente documento en células presentadoras de antígenos tomadas de un paciente y propagarse clonalmente *ex vivo* para trasplantar de nuevo al mismo paciente. Pueden reintroducirse células transfectadas en el paciente usando cualquier medio conocido en la técnica, preferentemente en forma estéril por administración intravenosa, intracavitaria, intraperitoneal o intratumoral.

Las rutas y frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento, así como la dosificación, variarán de individuo a individuo, y pueden establecerse fácilmente usando técnicas convencionales. En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), por vía intranasal (por ejemplo, por aspiración) o por vía oral. Preferentemente, pueden administrar entre 1 y 10 dosis a lo largo de un periodo de 52 semanas. Preferentemente, se administran 6 dosis, a intervalos de 1 mes, y pueden proporcionarse vacunas de refuerzo periódicamente a continuación. Pueden ser apropiados protocolos alternos para pacientes individuales. Una dosis adecuada es una cantidad de compuesto que, cuando se administra como se ha descrito anteriormente, es capaz de promover una respuesta inmune antitumoral y está al menos 10-50 % por encima del nivel basal (es decir, no tratado). Dicha respuesta puede controlarse midiendo los anticuerpos antitumorales en un paciente o por generación dependiente de vacuna de células efectoras citolíticas capaces de matar las células tumorales del paciente *in vitro*. Tales vacunas también deberían ser capaces de provocar una respuesta inmune que conduce a un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia sin enfermedad completa, parcial o más larga) en pacientes vacunados en comparación con pacientes no vacunados. En general, para composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden uno o más polipéptidos, la cantidad de cada polipéptido presente en una dosis varía de aproximadamente 25 µg a 5 mg por kg de huésped. Los tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del paciente, pero típicamente variarán entre aproximadamente 0,1 ml y aproximadamente 5 ml.

En general, un régimen de tratamiento y dosificación apropiados proporcionan el compuesto o compuestos activos en una cantidad suficiente para proporcionar beneficio terapéutico y/o profiláctico. Una respuesta tal puede controlarse estableciendo un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia sin enfermedad completa o parcial, o más larga) en pacientes tratados en comparación con pacientes no tratados. Los aumentos en respuestas inmunes preexistentes a una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico generalmente se correlacionan con un resultado clínico mejorado. Tales respuestas inmunes pueden evaluarse generalmente usando proliferación convencional, ensayos de citotoxicidad o de citocinas, que pueden realizarse usando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

#### 4.23 Detección de cáncer y diagnóstico

En general puede detectarse un cáncer en un paciente basándose en la presencia de una o más proteínas tumorales relacionadas con tumor maligno hematológico y/o polinucleótidos que codifican tales proteínas en una muestra biológica (por ejemplo, sangre, suero, esputo, orina y/o biopsias tumorales) obtenidas del paciente. En otras palabras, tales proteínas pueden usarse como marcadores para indicar la presencia o ausencia de un cáncer tal como tumor maligno hematológico. Además, tales proteínas pueden ser útiles para la detección de otros cánceres. Los agentes de unión proporcionados en el presente documento generalmente permiten la detección del nivel de antígeno que se une al agente en la muestra biológica. Pueden usarse cebadores y sondas polinucleotídicos para detectar el nivel de ARNm que codifica una proteína tumoral que también es indicativa de la presencia o ausencia de un cáncer. En general, una secuencia tumoral relacionada con tumor maligno hematológico debería estar presente a un nivel que es al menos tres veces mayor en el tejido tumoral que en el tejido normal.

Existe una diversidad de formatos de ensayo conocidos por los expertos en la materia para usar un agente de unión para detectar marcadores polipeptídicos en una muestra. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En general, la presencia o ausencia de un cáncer en un paciente puede determinarse por (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente con un agente de unión; (b) detectar en la muestra un nivel de polipéptido que se une al agente de unión; y (c) comparar el nivel de polipéptido con un valor de corte predeterminado.

En una realización preferida, el ensayo implica el uso de agente de unión inmovilizado en un soporte sólido para unirse a y retirar el polipéptido del resto de la muestra. El polipéptido unido puede después detectarse usando un reactivo de detección que contiene un grupo indicador y se une específicamente al agente de unión/complejo polipeptídico. Tales reactivos de detección pueden comprender, por ejemplo, un agente de unión que se une específicamente al polipéptido o un anticuerpo u otro agente que se une específicamente al agente de unión, tal como una anti inmunoglobulina, proteína G, proteína A o una lectina. Como alternativa, puede utilizarse un ensayo competitivo, en el que se marca un polipéptido con un grupo indicador y se permite que se una con el agente de unión inmovilizado después de la incubación del agente de unión con la muestra. El grado en que los componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado con el agente de unión es indicativo de la reactividad de la muestra con el agente de unión inmovilizado. Los polipéptidos adecuados para su uso dentro de tales ensayos incluyen proteínas tumorales relacionadas con tumor maligno hematológico de longitud completa y partes de las mismas a las que se une el agente de unión, como se ha descrito anteriormente.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos en la materia al que puede unirse la proteína tumoral. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un pocillo de ensayo en una placa de microtitulación o una membrana de nitrocelulosa o de otro tipo adecuada. Como alternativa, el soporte puede ser una perla o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tal como los desvelados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.359.681. El agente de unión puede inmovilizarse en el soporte sólido usando una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia, que se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica. En el contexto de la presente invención, el término "inmovilización" se refiere tanto a asociación no covalente, tal como adsorción, como a unión covalente (que puede ser un engarce directo entre el agente y grupos funcionales en el soporte o puede ser un engarce por medio de un agente de reticulación). Se prefiere inmovilización por adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana. En tales casos, la adsorción puede conseguirse poniendo en contacto el agente de unión, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante una cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero está típicamente entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 1 día. En general, poner en contacto un pocillo de una placa de microtitulación de plástico (tal como poliestireno o cloruro de polivinilo) con una cantidad de agente de unión que varía de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 10 µg, y preferentemente de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 µg, es suficiente para inmovilizar una cantidad adecuada de agente de unión.

La unión covalente de agente de unión a un soporte sólido puede generalmente conseguirse haciendo reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionara con tanto el soporte como un grupo funcional, tal como un grupo hidroxilo o amino, en el agente de unión. Por ejemplo, el agente de unión puede unirse covalentemente a soportes que tienen un revestimiento de polímero apropiado usando benzoquinona o por condensación de un grupo aldehído en el soporte con una amina y un hidrógeno activo en el compañero de unión (véase, por ejemplo, Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, at A12-A13).



En ciertas realizaciones, el ensayo es un ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos. Este ensayo puede realizarse poniendo en contacto primero un anticuerpo que se ha inmovilizado en un soporte sólido, habitualmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la muestra, de modo que se permite a los polipéptidos dentro de la muestra unirse al anticuerpo inmovilizado. La muestra no unida se retira después de los complejos de anticuerpo-polipéptido inmovilizados y se añade un reactivo de detección (preferentemente un segundo anticuerpo capaz de unirse a un sitio diferente del polipéptido) que contiene un grupo indicador. La cantidad de reactivo de detección que permanece unida al soporte sólido se determina después usando un procedimiento apropiado para el grupo indicador específico.

Más específicamente, una vez que el anticuerpo se inmoviliza en el soporte como se ha descrito anteriormente, los sitios de unión a proteína restantes en el soporte típicamente se bloquean. Cualquier agente de bloqueo adecuado conocido por los expertos en la materia, tal como albúmina de suero bovino o Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El anticuerpo inmovilizado se incuba después con la muestra y se permite que el polipéptido se una al anticuerpo. La muestra puede diluirse con un diluyente adecuado, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la incubación. En general, un tiempo de contacto apropiado (es decir, tiempo de incubación) es un periodo de tiempo que es suficiente para detectar la presencia de polipéptido dentro de una muestra obtenida de un individuo con tumor maligno hematológico. Preferentemente, el tiempo de contacto es suficiente para conseguir un nivel de unión que es al menos aproximadamente 95 % del conseguido en equilibrio entre polipéptido unido y no unido. Los expertos en la materia reconocerán que el tiempo necesario para conseguir el equilibrio puede determinarse fácilmente ensayando el nivel de unión que se produce a lo largo de un periodo de tiempo. A temperatura ambiente, un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos es generalmente suficiente.

Puede retirarse después muestra no unida lavando el soporte sólido con un tampón apropiado, tal como PBS que contiene Tween 20™ 0,1 %. El segundo anticuerpo, que contiene un grupo indicador, puede después añadirse al soporte sólido. Los grupos indicadores preferidos incluyen los grupos indicados anteriormente.

El reactivo de detección se incuba después con el complejo de polipéptido-anticuerpo inmovilizado durante una cantidad de tiempo suficiente para detectar el polipéptido unido. Una cantidad de tiempo apropiada puede determinarse generalmente ensayando el nivel de unión que se produce a lo largo de un periodo de tiempo. El reactivo de detección no unido se retira después y se detecta el reactivo de detección unido usando el grupo indicador. El procedimiento empleado para detectar el grupo indicador depende de la naturaleza del grupo indicador. Para grupos radiactivos, son generalmente apropiados procedimientos de conteo de centelleo o autorradiográficos. Pueden usarse procedimientos espectroscópicos para detectar colorantes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. Puede detectarse biotina usando avidina, acoplada a un grupo indicador diferente (habitualmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Pueden detectarse generalmente los grupos indicadores de enzima mediante la adición de sustrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico), seguido de análisis espectroscópico o de otro tipo de los productos de reacción.

Para determinar la presencia o ausencia de un cáncer, tal como un tumor maligno hematológico, la señal detectada del grupo indicador que permanece unida al soporte sólido se compara en general con una señal que corresponde a un valor de corte predeterminado. En una realización preferida, el valor de corte para la detección de un cáncer es la señal media obtenida cuando el anticuerpo inmovilizado se incuba con muestras de pacientes sin el cáncer. En general, una muestra que genera una señal que está tres desviaciones típicas por encima del valor de corte predeterminado se considera positiva para el cáncer. En una realización preferida alternativa, el valor de corte se determina usando una curva operativa del receptor, de acuerdo con el procedimiento de Sackett y col., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7. Brevemente, en esta realización, el valor de corte puede determinarse a partir de una representación de pares de tasas de positivos verdaderos (es decir, sensibilidad) y tasas de falsos positivos (100 %-especificidad) que corresponden a cada valor de corte posible para el resultado del ensayo de diagnóstico. El valor de corte en la representación que es el más cercano a la esquina superior izquierda (es decir, el valor que abarca el área más grade) es el valor de corte más preciso y una muestra que genera una señal que es mayor que el valor de corte determinado por este procedimiento puede considerarse positiva. Como alternativa, el valor de corte puede desplazarse a la izquierda a lo largo de la representación, para minimizar la tasa de falso positivo, o a la derecha, para minimizar la tasa de falso negativo. En general, una muestra que genera una señal que es mayor que el valor de corte determinado por este procedimiento se considera positiva para un cáncer.

En una realización relacionada, el ensayo se realiza en un formato de ensayo en tira o flujo continuo, en el que el agente de unión se inmoviliza en una membrana, tal como nitrocelulosa. En el ensayo de flujo continuo, los polipéptidos dentro de la muestra se unen al agente de unión inmovilizado a medida que la muestra pasa a través de la membrana. Un segundo agente de unión marcado se une después al complejo de polipéptido-agente de unión a medida que una solución que contiene un segundo agente de unión fluye a través de la membrana. La detección de segundo agente de unión unido puede después realizarse como se ha descrito anteriormente. En el formato de ensayo de tira, un extremo de la membrana a la que se une el agente de unión se sumerge en una solución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene segundo agente de unión y al área de agente de unión inmovilizado. La concentración del segundo agente de unión en el área de anticuerpo inmovilizado indica la presencia de un cáncer. Típicamente, la concentración de segundo agente de unión en ese sitio genera un patrón, tal como una línea, que puede leerse visualmente. La ausencia de un patrón tal indica un resultado negativo. En general, la cantidad de agente de unión inmovilizado en la membrana se

selecciona para generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contiene un nivel de polipéptido que sería suficiente para generar una señal positiva en el ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos, en el formato analizado anteriormente. Los agentes de unión preferidos para su uso en tales ensayos son anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Preferentemente, la cantidad de anticuerpo

5 inmovilizado en la membrana varía de aproximadamente 25 ng a aproximadamente 1 µg, y más preferentemente de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 500 ng. Tales ensayos pueden realizarse típicamente con una cantidad muy pequeña de muestra biológica.

Por supuesto, existen numerosos otros protocolos de ensayo que son adecuados para su uso con las proteínas tumorales o agentes de unión de la presente invención. Se pretende que las descripciones anteriores sean

10 solamente ejemplares. Por ejemplo, resultará evidente para los expertos en la materia que los protocolos anteriores pueden modificarse fácilmente para usar polipéptidos tumorales relacionados con tumor maligno hematológico para detectar anticuerpos que se unen a tales polipéptidos en una muestra biológica. La detección de tales anticuerpos específicos de proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico puede correlacionarse con la presencia de un cáncer.

Un cáncer puede también, o como alternativa, detectarse basándose en la presencia de linfocitos T que reaccionan de forma específica con una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico en una muestra biológica. Dentro de ciertos procedimientos, una muestra biológica que comprende linfocitos T CD4+ y/o CD8+ aislados de un paciente se incuba con un polipéptido tumoral relacionado con tumor maligno hematológico, un polinucleótido que codifica dicho polipéptido y/o una APC que expresa al menos una parte inmunogénica de un

15 polipéptido tal y se detecta la presencia o ausencia de activación específica de los linfocitos T. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, linfocitos T aislados. Por ejemplo, pueden aislarse linfocitos T de un paciente por técnicas rutinarias (tales como por centrifugación de gradiente de densidad de Ficoll/Hypaque de linfocitos de sangre periférica). Los linfocitos T pueden incubarse in vitro durante 2-9 días (típicamente 4 días) a 37 °C con polipéptido (por ejemplo, 5 - 25 µg/ml). Puede ser deseable incubar otra alícuota de una muestra de linfocitos

20 T en ausencia de polipéptido tumoral relacionado con tumor maligno hematológico para actuar como un control. Para los linfocitos T CD4+, la activación se detecta preferentemente evaluando la proliferación de los linfocitos T. Para linfocitos T CD8+, la activación se detecta preferentemente evaluando la actividad citolítica. Un nivel de proliferación que es al menos dos veces mayor y/o un nivel de actividad citolítica que es al menos 20 % mayor que en pacientes sin enfermedad indica la presencia de un cáncer en el paciente.

Como se ha observado anteriormente, un cáncer puede también, o como alternativa, detectarse basándose en el nivel de ARNm que codifica una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico en una muestra biológica. Por ejemplo, pueden emplearse al menos dos cebadores oligonucleotídicos en un ensayo basado en

25 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una parte de un ADNc tumoral relacionado con tumor maligno hematológico derivado de una muestra biológica, en el que al menos uno de los cebadores oligonucleotídicos es específico para (es decir, hibrida con) un polinucleótido que codifica la proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico. El ADNc amplificado se separa después y se detecta usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como electroforesis en gel. De forma similar, pueden usarse sondas oligonucleotídicas que hibridan específicamente con un polinucleótido que codifica una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico en un ensayo de hibridación para detectar la presencia de polinucleótido que

30 codifica la proteína tumoral en una muestra biológica.

Para permitir la hibridación en condiciones de ensayo, los cebadores y sondas oligonucleotídicas deberían comprender una secuencia oligonucleotídica que tenga al menos aproximadamente 60 %, preferentemente al menos aproximadamente 75 % y más preferentemente al menos aproximadamente 90 %, de identidad con una parte de un

35 polinucleótido que codifica una proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico que de al menos 10 nucleótidos y preferentemente al menos 20 nucleótidos, de longitud. Preferentemente, los cebadores y/o sondas oligonucleotídicas hibridan con un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en el presente documento en condiciones moderadamente rigurosas, como se ha definido anteriormente. Los cebadores y/o sondas oligonucleotídicas que pueden emplearse de forma útil en los procedimientos de diagnóstico descritos en el presente documento preferentemente son de al menos 10-40 nucleótidos de longitud. En una realización preferida, los

40 cebadores oligonucleotídicos comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos, más preferentemente al menos 15 nucleótidos contiguos, de una molécula de ADN que tiene una secuencia desvelada en la presente solicitud. Se conocen bien en la materia técnicas para tanto ensayos basados en PCR como ensayos de hibridación (véase, por ejemplo, Mullis y col., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, 1987; Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989).

Un ensayo preferido emplea RT-PCR, en la que se aplica PCR junto con transcripción inversa. Típicamente, se extrae ARN de una muestra biológica, tal como un tejido de biopsia y se transcribe de forma inversa para producir moléculas de ADNc. La amplificación por PCR usando al menos un cebador específico genera una molécula de

45 ADNc, que puede separarse y visualizarse usando, por ejemplo, electroforesis en gel. Puede realizarse amplificación en muestras biológicas tomadas de un paciente de ensayo y de un individuo que no está aquejado de cáncer. La reacción de amplificación puede realizarse en varias diluciones de ADNc que abarcan dos órdenes de magnitud. Un aumento de dos veces o mayor en la expresión en varias diluciones de la muestra de paciente de ensayo en comparación con las mismas diluciones de la muestra no cancerosa se considera típicamente positivo.

En otra realización, las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse como marcadores de la progresión de cáncer. En esta realización, pueden realizarse ensayos como se ha descrito anteriormente para el diagnóstico de un cáncer a lo largo del tiempo y evaluarse el cambio en el nivel de polipéptido o polipéptidos o polinucleótido o polinucleótidos reactivos. Por ejemplo, los ensayos pueden realizarse cada 24-72 horas durante un periodo de 6 meses a 1 año y a continuación realizarse según se necesiten. En general, un cáncer está progresando en los pacientes en los que el nivel de polipéptido o polinucleótido detectado aumenta a lo largo del tiempo. Por el contrario, el cáncer no progresa cuando el nivel de polipéptido o polinucleótido reactivo permanece constante o se reduce con el tiempo.

Pueden realizarse ciertos ensayos de diagnóstico *in vivo* directamente en un tumor. Un ensayo tal implica poner en contacto las células tumorales con un agente de unión. El agente de unión unido puede después detectarse directa o indirectamente mediante un grupo indicador. Tales agentes de unión también pueden usarse en aplicaciones histológicas. Como alternativa, pueden usarse sondas polinucleotídicas dentro de tales aplicaciones.

Como se ha observado anteriormente, para mejorar la sensibilidad, pueden ensayarse múltiples marcadores proteicos tumorales relacionados con tumor maligno hematológico dentro de una muestra dada. Resultará evidente que pueden combinarse agentes de unión específicos para diferentes proteínas proporcionados en el presente documento dentro de un ensayo sencillo. Además, pueden usarse múltiples sondas o cebadores simultáneamente. La selección de marcadores proteicos tumorales puede basarse en experimentos rutinarios para determinar combinaciones que dan como resultado sensibilidad óptima. Además, o como alternativa, los ensayos para proteínas tumorales proporcionadas en el presente documento pueden combinarse con ensayos para otros antígenos tumorales conocidos.

#### 4.24 Preparación de secuencias de ADN

Ciertas secuencias de ácido nucleico de moléculas de ADNc que codifican partes de antígenos relacionados con tumor maligno hematológico se aislaron por sustracción basada en PCR<sup>TM</sup>. Esta técnica sirve para normalizar los ADNc expresados de forma diferencial, facilitando la recuperación de transcritos poco habituales y también tiene la ventaja de permitir el enriquecimiento de ADNc con pequeñas cantidades de material de ARN poliA y sin múltiples ciclos de hibridación. Para obtener antígenos sobreexpresados en linfomas no de Hodgkin, se realizaron dos sustracciones con una biblioteca de ensayo preparada a partir de un grupo de tres ARNm de linfoma no de Hodgkin de linfocitos T. Las dos bibliotecas se sustrajeron independientemente con diferentes grupos de ADNc controladores. El controlador nº 1 contenía ADNc preparado de tejidos normales específicos (ganglio linfático, médula ósea, linfocitos T, corazón y cerebro), y esta sustracción generó la biblioteca TCS-D1 (biblioteca sustraída de linfoma no de Hodgkin de linfocitos T con controlador nº 1). El controlador nº 2 contenía tejidos normales no específicos (colon, intestino grueso, pulmón, páncreas, médula espinal, músculo esquelético, hígado, riñón, piel y cerebro) y esta sustracción generó la biblioteca TCS-D2 (biblioteca de sustracción de linfoma no de Hodgkin de linfocitos T con controlador nº 2). Se realizaron dos sustracciones adicionales con una biblioteca de ensayo preparada a partir de un grupo de tres ARNm de linfoma no de Hodgkin de linfocitos B. Las dos bibliotecas se sustrajeron independientemente con diferentes grupos de ADNc controladores. El controlador nº 1 contenía ADNc preparado a partir de tejidos normales específicos (ganglio linfático, médula ósea, linfocitos B, corazón y cerebro) y esta sustracción generó la biblioteca BCNHL/D1 (biblioteca sustraída de linfoma no de Hodgkin de linfocitos B con controlador nº 1). El controlador nº 2 contenía tejidos normales no específicos (cerebro, pulmón, páncreas, médula espinal, músculo esquelético, colon, bazo, intestino grueso y PBMC) y esta sustracción generó la biblioteca BCNHL/D2 (biblioteca de sustracción de linfoma no de Hodgkin de linfocitos B con controlador nº 2). Se generaron grupos amplificados por PCR<sup>TM</sup> a partir de las bibliotecas sustraídas y se secuenciaron los clones.

Las secuencias antigénicas relacionadas con tumor maligno hematológico pueden caracterizarse adicionalmente usando cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas. Por ejemplo, los clones amplificados por PCR<sup>TM</sup> pueden disponerse sobre portaobjetos de vidrio para análisis de microseries. Para determinar la distribución tisular, los clones dispuestos pueden usarse como dianas para hibridar con diferentes sondas de ADNc de primera cadena. Incluyendo sondas de linfoma, sondas de leucemia y sondas de diferentes tejidos normales. Pueden generarse sondas de leucemia y linfoma a partir de muestras criopreservadas obtenidas en el momento de diagnóstico de NHL, enfermedad de Hodgkin, AML, CML, CLL, ALL, MDS y pacientes con mieloma con resultado negativo (pacientes que no han conseguido remisión completa después de quimioterapia convencional o han recaído) o buen resultado (pacientes que han conseguido remisión a largo plazo). Para analizar la expresión génica durante la diferenciación hematopoyética, se pueden generar sondas de fracciones >95 % puras de células CD34+, CD2+, CD14+, CD15+ y CD19+ derivadas de individuos sanos.

Pueden prepararse generalmente variantes de polinucleótidos por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo síntesis química por, por ejemplo, síntesis química de fosoramidita de fase sólida. También pueden introducirse modificaciones en una secuencia polinucleotídica usando técnicas de mutagénesis convencionales, tales como mutagénesis específica de sitio dirigida a oligonucleótidos (véase Adelman y col., DNA 2:183, 1983). Como alternativa, pueden generarse moléculas de ARN por transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN, siempre que el ADN se incorpore en un vector con un promotor de ARN polimerasa adecuado (tal como T7 o SP6). Pueden usarse ciertas partes para preparar un polipéptido codificado, como se describe en el presente documento. Además, o como alternativa, puede administrarse una parte a un paciente de modo que se genere el polipéptido

codificado *in vivo* (por ejemplo, transfectando células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, con una construcción de ADNc que codifica un antígeno relacionado con tumor maligno hematológico y administrando las células transfectadas al paciente).

5 También puede usarse una parte de una secuencia complementaria a una secuencia codificante (es decir, un polinucleótido antisentido) como una sonda o para modular la expresión de antígenos relacionados con tumor maligno hematológico. Las construcciones de ADNc que pueden transcribirse en ARN antisentido también pueden introducirse en células o tejidos para facilitar la producción de ARN antisentido. Puede usarse un polinucleótido antisentido, como se describe en el presente documento, para inhibir la expresión de un antígeno relacionado con tumor maligno hematológico. Puede usarse tecnología antisentido para controlar la expresión génica a través de formación de triple hélice, que compromete la capacidad de la doble hélice para abrirse suficientemente para la unión de polimerasas, factores de transcripción o moléculas reguladoras (véase Gee y col., en Huber y Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co. (Mt. Kisco, NY; 1994)). Como alternativa, puede diseñarse una molécula antisentido para hibridar con una región de control de un gen (por ejemplo, promotor, potenciador o sitio de inicio de la transcripción) y bloquear la transcripción del gen; o para bloquear la traducción inhibiendo la unión de un transcrito a ribosomas.

10 También puede diseñarse una parte de una secuencia codificante o de una secuencia complementaria como una sonda o cebador para detectar expresión génica. Las sondas pueden marcarse con una diversidad de grupos indicadores, tales como radionúclidos y enzimas y son preferentemente de al menos 10 nucleótidos, más preferentemente, al menos 20 nucleótidos de longitud y aún más preferentemente al menos 30 nucleótidos de longitud. Los cebadores, como se ha observado anteriormente, son preferentemente de 22-30 nucleótidos de longitud.

15 Cualquier polinucleótido puede modificarse adicionalmente para aumentar la estabilidad *in vivo*. Las posibles modificaciones incluyen, pero sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3'; el uso de fosforioato o 2' O-etilo en lugar de engarces de fosfodiesterasa en la cadena principal; y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wybutosina, así como formas acetilmetil, tio y otras modificadas de adenina, citidina, guanina, timina y uridina.

20 Los polinucleótidos antigénicos relacionados con tumor maligno hematológico pueden unirse a una diversidad de otras secuencias de nucleótidos usando técnicas de ADN recombinante establecidas. Por ejemplo, puede clonarse un polinucleótido en cualquiera de una diversidad de vectores de clonación, incluyendo plásmidos, fagémidos, derivados de fagos lambda y cósmidos. Los vectores de interés particular incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación. En general, un vector contendrá un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables. Otros elementos dependerán del uso deseado y resultarán evidentes para los expertos en la materia.

25 Dentro de ciertas realizaciones, pueden formularse polinucleótidos para permitir la entrada en una célula de un mamífero y expresión en la misma. Tales formulaciones son particularmente útiles para fines terapéuticos, como se describe posteriormente. Los expertos en la materia apreciarán que existen muchas maneras de conseguir expresión de un polinucleótido en una célula diana y puede emplearse cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, puede incorporarse un polinucleótido en un vector viral, tal como, pero sin limitación, adenovirus, virus adenoasociado, retrovirus o vaccinia u otro pox virus (por ejemplo, virus de la viruela aviar). Se conocen bien por los expertos en la materia técnicas para incorporar ADN en tales vectores. Puede transferirse adicionalmente un vector retroviral o incorporar un gen para un marcador seleccionable (para ayudar en la identificación o selección de células transducidas) y/o un resto de dirección, tal como un gen que codifica un ligando para un receptor en una célula diana específica, para hacer al vector específico de diana. La dirección también puede conseguirse usando un anticuerpo, por procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

30 Otras formulaciones para fines terapéuticos incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido para su uso como un vehículo de suministro *in vitro* e *in vivo* en un liposoma (es decir, una vesícula de membrana artificial). La preparación y uso de tales sistemas se conocen bien en la técnica.

#### 4.25 Procedimientos terapéuticos

35 En aspectos adicionales de la presente invención, las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para inmunoterapia de neoplasias hematológicas incluyendo AML pediátrica, CML, ALL, CLL, síndromes mielodisplásicos (MDS), síndromes mieloproliferativos (MPS), leucemia secundaria, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin y linfomas no de Hodgkin. Además, las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para terapia de enfermedades asociadas con una respuesta autoinmune contra células precursoras hematopoyéticas, tales como anemia aplásica grave.

Puede realizarse inmunoterapia usando cualquiera de una diversidad de técnicas, en las que los compuestos o

células proporcionadas en el presente documento actúan para retirar células que expresan antígeno relacionado con tumor maligno hematológico de un paciente. Dicha retirada puede tener lugar como resultado de potenciar o inducir una respuesta inmune en un paciente específica para antígeno relacionado con tumor maligno hematológico o una célula que expresa antígeno relacionado con tumor maligno hematológico. Como alternativa, las células que expresan antígeno relacionado con tumor maligno hematológico pueden retirarse *ex vivo* (por ejemplo, por tratamiento de médula ósea autóloga, sangre periférica o una fracción de médula ósea o sangre periférica). Pueden obtenerse fracciones de médula ósea o sangre periférica usando cualquier técnica convencional en la materia.

Dentro de tales procedimientos, típicamente se administran composiciones farmacéuticas y vacunas a un paciente. Como se usa en el presente documento, un "paciente" se refiere a cualquier animal de sangre caliente, preferentemente un ser humano. Un paciente puede estar o no aquejado de un tumor maligno hematológico. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas y vacunas anteriores pueden usarse para prevenir el desarrollo de un tumor maligno o para tratar a un paciente aquejado de un tumor maligno. Puede diagnosticarse un tumor maligno hematológico usando criterios generalmente aceptados en la técnica. Las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden administrarse antes o después de la retirada quirúrgica de tumores primarios y/o tratamiento tal como administración de radioterapia o fármacos quimioterapéuticos convencionales o trasplante de médula ósea (autólogo, alogénico o singénico).

Dentro de ciertas realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia activa, en la que el tratamiento se basa en la estimulación *in vivo* del sistema inmune del huésped endógeno para reaccionar contra tumores con la administración de agentes modificadores de la respuesta inmune (tales como polipéptidos y polinucleótidos como se proporcionan en el presente documento).

Dentro de otras realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia pasiva, en la que el tratamiento implica el suministro de agentes con reactividad inmune para tumores establecidos (tales como células efectoras o anticuerpos) que pueden mediar directa o indirectamente los efectos antitumorales y no dependen necesariamente de un sistema inmune del huésped intacto. Los ejemplos de células efectoras incluyen linfocitos T como se ha analizado anteriormente, linfocitos T (tales como linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y linfocitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares que se filtran en tumores), linfocitos citolíticos (tales como linfocitos citolíticos naturales y linfocitos citolíticos activados por linfocina), linfocitos B y células presentadoras de antígenos (tales como células dendríticas y macrófagos) que expresan un polipéptido proporcionado en el presente documento. Los receptores de linfocitos T y receptores de anticuerpos específicos para los polipéptidos enumerados en el presente documento pueden clonarse, expresarse y transferirse a otros vectores o células efectoras para inmunoterapia adoptiva. Los polipéptidos proporcionados en el presente documento también pueden usarse para generar anticuerpos o anticuerpos anti-idiotípicos (como se ha descrito anteriormente y en la Patente de Estados Unidos N° 4.918.164) para inmunoterapia pasiva.

Pueden obtenerse células efectoras generalmente en cantidades suficientes para inmunoterapia adoptiva por crecimiento *in vitro*, como se describe en el presente documento. Las condiciones de cultivo para expandir células efectoras específicas de antígeno sencillo a varios miles de millones en número con retención del reconocimiento de antígeno *in vivo* se conocen bien en la técnica. Tales condiciones de cultivo *in vitro* usan típicamente estimulación intermitente con antígeno, con frecuencia en presencia de citocinas (tales como IL-2) y células alimentadoras no en división. Como se ha observado anteriormente, los polipéptidos inmunorreactivos como se proporcionan en el presente documento pueden usarse para expandir rápidamente los cultivos de linfocitos T específicos de antígeno para generar un número suficiente de células para inmunoterapia. En particular, las células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, macrófagos o linfocitos B, pueden pulsarse con polipéptidos inmunorreactivos o transfectarse con uno o más polinucleótidos usando técnicas convencionales bien conocidas en la materia. Por ejemplo, las células presentadoras de antígenos pueden transfectarse con un polinucleótido que tiene un promotor apropiado para aumentar la expresión en un virus recombinante u otro sistema de expresión. Las células efectoras cultivadas para su uso en terapia deben ser capaces de crecer y distribuirse ampliamente y sobrevivir a largo plazo *in vivo*. Los estudios han mostrado que puede inducirse a las células efectoras cultivadas para que crezcan *in vivo* y para que sobrevivan a largo plazo en números sustanciales por estimulación repetida con antígeno complementado con IL-2 (véase, por ejemplo, Cheever y col., *Immunological Reviews* 157:177, 1997).

Como alternativa, puede introducirse un vector que exprese un polipéptido enumerado en el presente documento en células presentadoras de antígenos tomadas de un paciente y propagarse clonalmente *ex vivo* para trasplante de vuelta al mismo paciente. Las células transfectadas pueden reintroducirse al paciente usando cualquier medio conocido en la materia, preferentemente en forma estéril por administración intravenosa, intracavitaria, intraperitoneal o intratumoral.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden usarse solas o en combinación con regímenes terapéuticos convencionales tales como cirugía, irradiación, quimioterapia y/o trasplante de médula ósea (autóloga, singénica, alogénica o no relacionada). Como se analiza en más detalle posteriormente, pueden usarse agentes de unión y linfocitos T como se proporcionan en el presente documento para purgar células madre autólogas. Dicha purga puede ser beneficiosa antes de, por ejemplo, trasplante de médula ósea o transfusión de sangre o componentes de la misma. Pueden usarse adicionalmente agentes de unión, linfocitos T, células presentadoras de antígeno (APC) y composiciones proporcionadas en el presente documento para expandir y estimular (o sensibilizar) linfocitos T específicos de antígeno relacionado con tumor maligno hematológico autólogos,

allogénicos, singénicos o no relacionados *in vitro* y/o *in vivo*. Tales linfocitos T específicos de antígeno relacionado con tumor maligno hematológico pueden usarse, por ejemplo, dentro de infusiones de linfocitos de donante.

Las vías y frecuencia de administración de las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento, así como la dosificación, variarán de individuo a individuo y pueden establecerse fácilmente usando técnicas convencionales. En general, las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intracutánea, intramuscular, intravenosa o subcutánea), por vía intranasal (por ejemplo, por aspiración) o por vía oral. Preferentemente, pueden administrarse entre 1 y 10 dosis durante un periodo de 52 semanas. Preferentemente, se administran 6 dosis, en intervalos de 1 mes, y pueden proporcionarse vacunas de refuerzo periódicamente en lo sucesivo. Pueden ser apropiados protocolos alternos para pacientes individuales. Una dosis adecuada es una cantidad de un compuesto que, cuando se administra como se ha descrito anteriormente, es capaz de promover una respuesta inmune antitumoral y está al menos 10-50 % por encima del nivel basal (es decir, no tratado). Dicha respuesta puede controlarse midiendo los anticuerpos antitumorales en un paciente o por generación dependiente de vacuna de células efectoras citotóxicas capaces de matar las células tumorales del paciente *in vitro*. Tales vacunas también deberían ser capaces de provocar una respuesta inmune que conduzca a un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia completa o parcial o sin enfermedad más larga) en pacientes vacunados en comparación con pacientes no vacunados. En general, para composiciones farmacéuticas y vacunas que comprenden uno o más polipéptidos, la cantidad de cada polipéptido presente en una dosis varía de aproximadamente 100 µg a 5 mg por kg de huésped. Los tamaños de dosis adecuados variarán con el tamaño del paciente, pero típicamente variarán de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml.

En general, una dosificación y régimen de tratamiento apropiados proporciona el compuesto o compuestos activos en una cantidad suficiente para proporcionar beneficio terapéutico y/o profiláctico. Dicha respuesta puede controlarse estableciendo un resultado clínico mejorado (por ejemplo, remisiones más frecuentes, supervivencia completa o parcial o sin enfermedad más larga) en pacientes tratados en comparación con pacientes no tratados. Los aumentos en respuestas inmunes preexistentes para un antígeno relacionado con tumor maligno hematológico generalmente se correlacionan con un resultado clínico mejorado. Tales respuestas inmunes pueden generalmente evaluarse usando ensayos de proliferación, citotoxicidad o citocinas convencionales, que pueden realizarse usando muestras obtenidas de un paciente antes y después del tratamiento.

Dentro de aspectos adicionales, los procedimientos para inhibir el desarrollo de un tumor maligno asociado con expresión de antígeno relacionado con tumor maligno hematológico implican la administración de linfocitos T autólogos que se han activado en respuesta a un polipéptido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico o APC que expresa antígeno relacionado con tumor maligno hematológico, como se ha descrito anteriormente. Tales linfocitos T pueden ser CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> y pueden proliferar como se ha descrito anteriormente. Los linfocitos T pueden administrarse al individuo en una cantidad eficaz para inhibir el desarrollo de una enfermedad maligna. Típicamente, se administran de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^{11}$  linfocitos T/M<sup>2</sup> por vía intravenosa, intracavitaria o en el lecho de un tumor resecaado. Resultará evidente para los expertos en la materia que el número de células y la frecuencia de administración dependerán de la respuesta del paciente.

Dentro de ciertas realizaciones, pueden estimularse linfocitos T antes de un trasplante de médula ósea autóloga. Dicha estimulación puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*. Para estimulación *in vitro*, la médula ósea y/o sangre periférica (o una fracción de médula ósea o sangre periférica) obtenida de un paciente puede ponerse en contacto con un polipéptido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico, un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico y/o una APC que expresa un polipéptido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la estimulación de linfocitos T como se ha descrito anteriormente. Después pueden administrarse médula ósea, células madre de sangre periférica y/o linfocitos T específicos de antígeno relacionado con tumor maligno hematológico a un paciente usando técnicas convencionales.

Dentro de las realizaciones relacionadas, los linfocitos T de un donante relacionado o no relacionado pueden estimularse antes de un trasplante de médula ósea singénica o allogénica (relacionada o no relacionada). Dicha estimulación puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*. Para estimulación *in vitro*, puede ponerse en contacto médula ósea y/o sangre periférica (o una fracción de médula ósea o sangre periférica) obtenida de un donante relacionado o no relacionado con un polipéptido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico, polinucleótido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico y/o APC que expresa un polipéptido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la estimulación de linfocitos T como se ha descrito anteriormente. Después pueden administrarse médula ósea, células madre de sangre periférica y/o linfocitos T específicos de antígeno relacionado con tumor maligno hematológico a un paciente usando técnicas convencionales.

Dentro de otras realizaciones, pueden usarse linfocitos T específicos de antígeno relacionado con tumor maligno hematológico, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describe en el presente documento para retirar células que expresan antígeno relacionado con tumor maligno hematológico de una muestra biológica, tal como médula ósea autóloga, sangre periférica o una fracción de médula ósea o sangre periférica (por ejemplo, sangre periférica (PB) enriquecida con CD34<sup>+</sup> antes de administración a un paciente). Tales procedimientos pueden realizarse poniendo en contacto la muestra biológica con tales linfocitos T, anticuerpos o fragmentos de

anticuerpo en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir la reducción de células que expresan antígeno relacionado con tumor maligno hematológico a menos del 10 %, preferentemente menos del 5 % y más preferentemente menos del 1 % del número total de células mieloides o linfáticas en la médula ósea o sangre periférica. Dicho contacto puede conseguirse, por ejemplo, usando una columna a la que se unen los anticuerpos usando técnicas convencionales. Las células que expresan antígeno se retienen en la columna. El grado en que dichas células se han retirado puede determinarse fácilmente por procedimientos convencionales tales como, por ejemplo, análisis de PCR cualitativo y cuantitativo, morfología, inmunohistoquímica y análisis de FACS. Después puede administrarse médula ósea o PB (o una fracción de la misma) a un paciente usando técnicas convencionales.

#### 4.26 Procedimientos de diagnóstico

En general, puede detectarse un tumor maligno hematológico en un paciente basándose en la presencia de antígeno y/o polinucleótido relacionado con tumor maligno hematológico en una muestra biológica (tal como sangre, suero, orina y/o biopsias de tumor) obtenida del paciente. En otras palabras, pueden usarse antígenos relacionados con tumor maligno hematológico como un marcador para indicar la presencia o ausencia de un tumor maligno tal. Los agentes de unión proporcionados en el presente documento permiten en general la detección del nivel de antígeno que se une al agente en la muestra biológica. Pueden usarse cebadores y sondas polinucleotídicas para detectar el nivel de antígeno relacionado con tumor maligno hematológico que codifica ARNm, que también es indicativo de la presencia o ausencia de un tumor maligno hematológico. En general, el antígeno relacionado con tumor maligno hematológico debería estar presente a un nivel que es al menos tres veces superior en una muestra obtenida de un paciente aquejado de un tumor maligno hematológico que en la muestra obtenida de un individuo no aquejado.

Existe una diversidad de formatos de ensayo conocidos por los expertos en la materia para usar un agente de unión para detectar marcadores polipeptídicos en una muestra. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En general, la presencia o ausencia de un tumor maligno hematológico en un paciente puede determinarse (a) poniendo en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente con un agente de unión; (b) detectando en la muestra un nivel de polipéptido que se une al agente de unión; y (c) comparando el nivel de polipéptido con un valor de corte predeterminado.

En una realización preferida, el ensayo implica el uso de agente de unión inmovilizado en un soporte sólido para unirse a y retirar el polipéptido del resto de la muestra. El polipéptido unido puede detectarse después usando un reactivo de detección que contiene un grupo indicador y específicamente se une al complejo de polipéptido/agente de unión. Tales reactivos de detección pueden comprender, por ejemplo, un agente de unión que se une específicamente al polipéptido o un anticuerpo u otro agente que se une específicamente al agente de unión, tal como una anti-inmunoglobulina, proteína G, proteína A o una lectina. Como alternativa, puede usarse un ensayo competitivo, en el que se marca un polipéptido con un grupo indicador y se le puede permitir unirse al agente de unión inmovilizado después de incubación del agente de unión con la muestra. El alcance al que los componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado con el agente de unión es indicativo de la reactividad de la muestra con el agente de unión inmovilizado. Los polipéptidos adecuados para su uso dentro de tales ensayos incluyen antígenos relacionados con tumor maligno hematológico o de longitud completa y partes de los mismos a los que se une el agente de unión, como se ha descrito anteriormente.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos en la materia al que puede unirse polipéptido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un pocillo de ensayo en una placa de microtitulación o una membrana de nitrocelulosa u otra adecuada. Como alternativa, el soporte puede ser una perla o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tal como los desvelados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.359.681. El agente de unión puede inmovilizarse en el soporte sólido usando una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia, que se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica. En el contexto de la presente invención, el término "inmovilización" se refiere tanto a asociación no covalente, tal como adsorción, como a unión covalente (que puede ser un engarce directo entre el agente y grupos funcionales en el soporte o puede ser un engarce por medio de un agente de reticulación). Se prefiere inmovilización por adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana. En tales casos, la adsorción puede conseguirse poniendo en contacto el agente de unión, en un tampón adecuado, con el soporte sólido durante una cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de contacto varía con la temperatura, pero está típicamente entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 1 día. En general, poner en contacto un pocillo de una placa de microtitulación de plástico (tal como poliestireno o cloruro de polivinilo) con una cantidad de agente de unión que varía de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 10 µg, y preferentemente de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 µg es suficiente para inmovilizar una cantidad adecuada de agente de unión.

En general puede conseguirse unión covalente de agente de unión a un soporte sólido haciendo reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con un grupo funcional, tal como un grupo hidroxilo o amino, en el agente de unión. Por ejemplo, el agente de unión puede unirse covalentemente a soportes que tienen un revestimiento polimérico apropiado usando benzoquinona o por condensación de un grupo aldehído en el soporte con una amina y un hidrógeno activo en el compañero de unión (véase, por ejemplo, Pierce

Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, en A12-A13).

En ciertas realizaciones, el ensayo es un ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos. Este ensayo puede realizarse poniendo primero en contacto un anticuerpo que se ha inmovilizado en un soporte sólido, habitualmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la muestra, de modo que se permite a los polipéptidos dentro de la muestra unirse al anticuerpo inmovilizado. La muestra no unida se retira después de los complejos de anticuerpo-polipéptido inmovilizados y se añade un reactivo de detección (preferentemente un segundo anticuerpo capaz de unirse a un sitio diferente en el polipéptido) que contiene un grupo indicador. La cantidad de reactivo de detección que permanece unida al soporte sólido se determina después usando un procedimiento apropiado para el grupo indicador específico.

Más específicamente, una vez que el anticuerpo se ha inmovilizado en el soporte como se ha descrito anteriormente, los sitios de unión a proteína restantes en el soporte típicamente se bloquean. Cualquier agente de bloqueo adecuado conocido por los expertos en la materia, tal como albúmina de suero bovino o Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El anticuerpo inmovilizado se incuba después con la muestra y se permite que el polipéptido se una al anticuerpo. La muestra puede diluirse con un diluyente adecuado, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la incubación. En general, un tiempo de contacto apropiado (es decir, tiempo de incubación) es un periodo de tiempo que es suficiente para detectar la presencia de polipéptido dentro de una muestra obtenida de un individuo con un tumor maligno hematológico. Preferentemente, el tiempo de contacto es suficiente para conseguir un nivel de unión que es al menos aproximadamente 95 % del conseguido en equilibrio entre polipéptido unido y no unido. Los expertos en la materia reconocerán que el tiempo necesario para conseguir equilibrio puede determinarse fácilmente ensayando el nivel de unión que se produce a lo largo de un periodo de tiempo. A temperatura ambiente, generalmente es suficiente un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos.

Después puede retirarse la muestra no unida lavando el soporte sólido con un tampón apropiado, tal como PBS que contiene Tween 20™ 0,1 %. El segundo anticuerpo, que contiene un grupo indicador, puede después añadirse al soporte sólido. Los grupos indicadores preferidos incluyen los grupos enumerados anteriormente.

El reactivo de detección se incuba después con el complejo del polipéptido-anticuerpo inmovilizado durante una cantidad de tiempo suficiente para detectar el polipéptido unido. Una cantidad apropiada de tiempo puede determinarse generalmente ensayando el nivel de unión que se produce a lo largo de un periodo de tiempo. El reactivo de detección no unido se retira después y se detecta el reactivo de detección unido usando el grupo indicador. El procedimiento empleado para detectar el grupo indicador depende de la naturaleza del grupo indicador. Para grupos reactivos, generalmente son apropiados procedimientos de conteo de centelleo o autorradiográficos. Pueden usarse procedimientos espectroscópicos para detectar colorantes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. Puede detectarse biotina usando avidina, acoplada a un grupo indicador diferente (habitualmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos indicadores de enzima pueden detectarse generalmente por la adición de sustrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico) seguido de análisis espectroscópico o de otro tipo de los productos de reacción.

Para determinar la presencia o ausencia de un tumor maligno hematológico, la señal detectada del grupo indicador que permanece unida al soporte sólido se compara en general con una señal que corresponde a un valor de corte predeterminado. En una realización preferida, el valor de corte para la detección de un tumor maligno hematológico es la señal media obtenida cuando el anticuerpo inmovilizado se incuba con muestras de pacientes sin el tumor maligno. En general, una muestra que genera una señal que está tres desviaciones típicas por encima del valor de corte predeterminado se considera positiva para el tumor maligno. En una realización alternativa preferida, el valor de corte se determina usando una Curva Operativa del Receptor, de acuerdo con el procedimiento de Sackett y col., *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7. Brevemente, en esta realización, el valor de corte puede determinarse a partir de una representación de pares de tasas de positivos verdaderos (es decir, sensibilidad) y tasas de falsos positivos (100 %-especificidad) que se corresponden con cada valor de corte posible para el resultado de ensayo de diagnóstico. El valor de corte en la representación que está más cerca de la esquina superior izquierda (es decir, el valor que abarca el área mayor) es el valor de corte más preciso y una muestra que genera una señal que es mayor que el valor de corte determinado por este procedimiento puede considerarse positiva. Como alternativa, el valor de corte puede desplazarse a la izquierda a lo largo de la representación, para minimizar la tasa de falsos positivos, o a la derecha, para minimizar la tasa de falsos negativos. En general, una muestra que genera una señal que es mayor que el valor de corte determinado por el siguiente procedimiento se considera positiva para un tumor maligno.

En una realización relacionada, el ensayo se realiza en un formato de ensayo en tira o de flujo continuo, en el que el agente de unión se inmoviliza en una membrana, tal como nitrocelulosa. En el ensayo de flujo continuo, los polipéptidos dentro de la muestra se unen al agente de unión inmovilizado a medida que la muestra pasa a través de la membrana. Un segundo agente de unión marcado se une después al complejo de polipéptido-agente de unión a medida que una solución que contiene el segundo agente de unión fluye a través de la membrana. La detección del segundo agente de unión unido puede después realizarse como se ha descrito anteriormente. En el formato de ensayo de tira, un extremo de la membrana al que está unido el agente se sumerge en una solución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene segundo agente de unión



y al área de agente de unión inmovilizado. La concentración de segundo agente de unión en el área de anticuerpo inmovilizado indica la presencia de un tumor maligno hematológico. Típicamente, la concentración del segundo agente de unión en ese sitio genera un patrón, tal como una línea, que puede leerse visualmente. La ausencia de un patrón tal indica un resultado negativo. En general, la cantidad de agente de unión inmovilizado en la membrana se selecciona para generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contiene un nivel de polipéptido que sería suficiente para generar una señal positiva en el ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos, en el formato analizado anteriormente. Los agentes de unión preferidos para su uso en tales ensayos son anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Preferentemente, la cantidad de anticuerpo inmovilizado en la membrana varía de aproximadamente 5 ng a aproximadamente 1 µg y más preferentemente de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 500 ng. Tales ensayos pueden realizarse típicamente una cantidad muy pequeña de muestra biológica.

Por supuesto, existen numerosos otros protocolos de ensayo que son adecuados para su uso con las secuencias antigénicas relacionadas con tumor maligno hematológico o agentes de unión de la presente invención. Se pretende que las anteriores descripciones sean solamente ejemplares. Por ejemplo, resultará evidente para los expertos en la materia que los protocolos anteriores pueden modificarse fácilmente para usar polipéptidos antigénicos relacionados con tumor maligno hematológico para detectar anticuerpos que se unen a tales polipéptidos en una muestra biológica. La detección de anticuerpos específicos de antígeno relacionado con tumor maligno hematológico puede correlacionarse con la presencia de un tumor maligno hematológico.

Un tumor maligno puede también, o como alternativa, detectarse basándose en la presencia de linfocitos T que reaccionan específicamente con antígeno relacionado con tumor maligno hematológico en una muestra biológica. Dentro de ciertos procedimientos, una muestra biológica que comprende linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> aislados de un paciente se incuba con un polipéptido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico, un polinucleótido que codifica un polipéptido tal y/o una APC que expresa un polipéptido tal y se detecta la presencia o ausencia de activación específica de los linfocitos T. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, linfocitos T aislados. Por ejemplo, se pueden aislar linfocitos T de un paciente por técnicas rutinarias (tales como por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll/Hypaque de linfocitos de sangre periférica). Pueden incubarse linfocitos T *in vitro* durante 2-9 días (típicamente 4 días) a 37 °C con polipéptido Mtb-81 o Mtb-67.2 (por ejemplo 5 - 25 µg/ml). Puede ser deseable incubar otra alícuota de una muestra de linfocitos T en ausencia de polipéptido antigénico relacionado con tumor maligno hematológico para actuar como un control. Para linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la activación se detecta preferentemente evaluando la proliferación de los linfocitos T. Para linfocitos T CD8<sup>+</sup>, la activación se detecta preferentemente evaluando la actividad citolítica. Un nivel de proliferación que es al menos dos veces mayor y/o un nivel de actividad citolítica que es al menos 20 % mayor que en pacientes sin enfermedad indica la presencia de un tumor maligno hematológico en el paciente.

Como se ha observado anteriormente, un tumor maligno hematológico puede también, o como alternativa, detectarse basándose en el nivel de ARNm que codifica antígeno relacionado con tumor maligno hematológico en una muestra biológica. Por ejemplo, pueden emplearse dos cebadores oligonucleotídicos en un ensayo basado en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una parte de ADNc de antígeno relacionado con tumor maligno hematológico derivado de una muestra biológica, en el que al menos uno de los cebadores oligonucleotídicos es específico para (es decir hibrida con) un polinucleótido que codifica la proteína antigénica relacionada con tumor maligno hematológico. El ADNc amplificado se separa después y se detecta usando técnicas bien conocidas en la materia, tales como electroforesis en gel. De forma similar, pueden usarse sondas oligonucleotídicas que hibridan específicamente con un polinucleótido que codifica antígeno relacionado con tumor maligno hematológico en un ensayo de hibridación para detectar la presencia de polinucleótido que codifica antígeno relacionado con tumor maligno hematológico en una muestra biológica.

Para permitir la hibridación en condiciones de ensayo, las sondas y cebadores oligonucleotídicos deberían comprender una secuencia oligonucleotídica que tenga al menos aproximadamente 60 %, preferentemente al menos aproximadamente 75 % y más preferentemente al menos aproximadamente 90 %, de identidad con una parte de un polinucleótido que codifica antígeno relacionado con tumor maligno hematológico que es al menos de 10 nucleótidos, y preferentemente al menos 20 nucleótidos, de longitud. Preferentemente, los cebadores y/o sondas oligonucleotídicas hibridan con un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en el presente documento en condiciones moderadamente rigurosas, como se ha definido anteriormente. Los cebadores y/o sondas oligonucleotídicas que pueden emplearse de forma útil en los procedimientos de diagnóstico descritos en el presente documento preferentemente son de al menos 10-40 nucleótidos de longitud. Se conocen bien en la materia técnicas para tanto ensayos basados en PCR como ensayos de hibridación (véase, por ejemplo, Mullis y col., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263, 1987; Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989).

Un ensayo preferido emplea RT-PCR, en el que se aplica PCR junto con transcripción inversa. Típicamente, se extrae ARN de una muestra biológica tal como un tejido de biopsia y se transcribe de forma inversa para producir moléculas de ADNc. La amplificación por PCR usando al menos un cebador específico genera una molécula de ADNc, que puede separarse y visualizarse usando, por ejemplo, electroforesis en gel. Puede realizarse amplificación en muestras biológicas tomadas de un paciente de ensayo y de un individuo que no está aquejado de un tumor maligno hematológico. La reacción de amplificación puede realizarse en varias diluciones de ADNc que abarcan dos órdenes de magnitud. Un aumento de dos veces o mayor en la expresión en varias diluciones de la muestra del

paciente de ensayo en comparación con las mismas diluciones de la muestra de un individuo normal se considera típicamente positivo.

5 En realizaciones preferidas, tales ensayos pueden realizarse usando muestras enriquecidas para células que expresan el antígeno o antígenos relacionados con tumor maligno hematológico de interés. Dicho enriquecimiento puede conseguirse, por ejemplo, usando un agente de unión como se proporciona en el presente documento para retirar las células del resto de la muestra biológica. Las células retiradas pueden después de ensayarse como se ha descrito anteriormente para muestras biológicas.

10 En realizaciones adicionales, pueden usarse antígenos relacionados con tumor maligno hematológico como marcadores para controlar la progresión de enfermedad o la respuesta a terapia de un tumor maligno hematológico. En esta realización, pueden realizarse ensayos como se ha descrito anteriormente para el diagnóstico de un tumor maligno hematológico a lo largo del tiempo y evaluarse el cambio en el nivel de polipéptido o polipéptidos reactivos. Por ejemplo, los ensayos pueden realizarse cada 24-72 horas durante un periodo de 6 meses a 1 año y a continuación realizarse según se necesiten. En general, un tumor maligno progresa en los pacientes en los que el nivel de polipéptido detectado por el agente de unión aumenta a lo largo del tiempo. Por el contrario, el tumor maligno no progresa cuando el nivel de polipéptido reactivo permanece constante o se reduce con el tiempo.

15 Pueden realizarse ciertos ensayos de diagnóstico *in vivo* directamente en un tumor. Un ensayo tal implica poner en contacto células tumorales con un agente de unión. El agente de unión unido puede detectarse después directa o indirectamente mediante un grupo indicador. Tales agentes de unión pueden usarse también en aplicaciones histológicas. Como alternativa, pueden usarse sondas polinucleotídicas dentro de tales aplicaciones.

20 Como se ha observado anteriormente, para mejorar la sensibilidad, pueden ensayarse marcadores múltiples dentro de una muestra dada. Resultará evidente que pueden combinarse agentes de unión específicos para diferentes proteínas proporcionadas en el presente documento dentro de un ensayo sencillo. Además, pueden usarse múltiples sondas o cebadores simultáneamente. La selección de marcadores puede basarse en experimentos rutinarios para determinar combinaciones que dan como resultado sensibilidad óptima.

25 Las aplicaciones de diagnóstico adicionales incluyen la detección de enfermedad extramedular (por ejemplo, infiltración cerebral de blastos en leucemias). Dentro de tales procedimientos, puede acoplarse un agente de unión a una sustancia indicadora y el diagnóstico se realiza *in vivo* usando técnicas bien conocidas. Puede administrarse agente de unión acoplado como se ha descrito anteriormente y puede detectarse enfermedad extramedular basándose en ensayar la presencia de sustancia indicadora. Como alternativa, una sustancia indicadora puede estar asociada con un linfocito T específico para antígeno relacionado con tumor maligno hematológico, lo que permite la detección de enfermedad extramedular basándose en ensayos para detectar la localización de la sustancia indicadora.

#### 4.27 Definiciones ejemplares

35 De acuerdo con la presente invención, las secuencias de ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, ADN (incluyendo y sin limitación ADN genómicos o extragenómicos), genes, ácidos péptido nucleicos (PNA), ARN (incluyendo, pero sin limitación ARNr, ARNm y ARNt), nucleósidos y segmentos de ácido nucleico adecuados obtenidos de fuentes nativas, sintetizados químicamente, modificados o preparados de otro modo completos o en parte por la mano del hombre.

40 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier procedimiento y composición similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, los procedimientos y composiciones preferidos se describen en el presente documento. Para fines de la presente invención, se definen los siguientes términos a continuación:

45 **Un:** De acuerdo con una convención de las leyes de patentes de larga vigencia, la palabra "un" cuando se usan en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones, indica "uno o más".

**Expresión:** La combinación de procedimientos intracelulares, incluyendo transcripción y traducción experimentados por un polinucleótido tal como un gen estructural para sintetizar el péptido o polipéptido codificado.

50 **Promotor:** Un término usado para describir de forma general la región o regiones de una secuencia de ácido nucleico que regula la transcripción.

**Elemento Regulador:** Una expresión usada para describir de forma general la región o regiones de una secuencia de ácido nucleico que regula la transcripción.

**Gen estructural:** Un gen o región de secuencia que se expresa para producir un péptido o polipéptido codificado

**Transformación:** Un procedimiento de introducción de una secuencia polinucleotídica exógena (por ejemplo un

vector, una molécula de ADN o ARN recombinante) en una célula huésped o protoplasto en el que se incorpora ese segmento de ácido nucleico exógeno en al menos un primer cromosoma o es capaz de replicación autónoma dentro de la célula huésped transformada. La transfección, electroporación y captación de ácido nucleico desnudo representan todos ejemplos de técnicas usadas para transformar una célula huésped con uno o más polinucleótidos.

- 5 **Célula transformada:** Una célula huésped cuyo complemento de ácido nucleico se ha alterado por la introducción de uno o más polinucleótidos exógenos en esa célula.

**Célula transgénica:** Cualquier célula derivada o regenerada a partir de una célula transformada o derivada de una célula transgénica o de la descendencia de cualquier generación de una célula huésped transformada tal.

- 10 **Animal transgénico:** Un animal o una descendencia de cualquier generación del mismo que deriva de una célula animal transformada, en el que el ADN del animal contienen una molécula de ácido nucleico exógena introducida no presente originalmente en un animal nativo, de tipo silvestre no transgénico de la misma especie. Las expresiones "animal transgénico" y "animal transformado" se han usado en ocasiones en la técnica como expresiones sinónimas para definir a un animal, cuyos contenidos genéticos se han modificado para contener uno o más segmentos de ácido nucleicos exógenos.

- 15 **Vector:** Una molécula de ácido nucleico, comprendida típicamente por ADN, capaz de replicación en una célula huésped y/o a la que puede unirse operativamente otro segmento de ácido nucleico para proporcionar replicación del segmento unido. Un plásmido, cósmido o un virus es un vector ejemplar.

Los términos "corresponde sustancialmente a", "sustancialmente homólogo" o "identidad sustancial" como se usa en el presente documento indican una característica de un ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos, en la que un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos seleccionada tiene al menos aproximadamente 70 o aproximadamente 75 por ciento de identidad de secuencia en comparación con un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada. Más típicamente, la secuencia seleccionada y la secuencia de referencia tendrán al menos aproximadamente 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 o incluso 85 por ciento de identidad de secuencia y más preferentemente al menos aproximadamente 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 ó 95 por ciento de identidad de secuencia. Aún más preferentemente, las secuencias altamente homólogas con frecuencia comparten más de al menos aproximadamente 96, 97, 98 ó 99 por ciento de identidad de secuencia entre la secuencia seleccionada y la secuencia de referencia con la que se compara. El porcentaje de identidad de secuencia puede calcularse a lo largo de la longitud total de las secuencias a comparar o puede calcularse excluyendo deleciones o adiciones pequeñas que suman en total menos de aproximadamente el 25 por ciento de la secuencia de referencia seleccionada. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, tal como una parte de un gen o secuencia flanqueante, o una parte repetitiva de un cromosoma. Sin embargo, en el caso de homología de secuencia de dos o más secuencias polinucleotídicas, la secuencia de referencia típicamente comprenderá al menos aproximadamente 18-25 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente de 26 a 35 nucleótidos e incluso más típicamente al menos aproximadamente 40, 50, 60, 70, 80, 90 o incluso 100 nucleótidos aproximadamente. De forma deseable, cuando se deseen fragmentos altamente homólogos, el grado de porcentaje de identidad entre las dos secuencias será de al menos aproximadamente 80 %, preferentemente al menos aproximadamente 85 % y más preferentemente aproximadamente el 90 % o 95 % o mayor, según se determina fácilmente por uno o más de los algoritmos de comparación de secuencia bien conocidos por los expertos en la materia, tales como por ejemplo, el análisis del programa FASTA descrito por Pearson y Lipman (1988).

- 40 La expresión "de origen natural" como se usa en el presente documento como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede hallarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que pueden aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por la mano del hombre en un laboratorio es de origen natural. Como se usa en el presente documento, las cepas de laboratorio de roedores que pueden haberse criado de forma selectiva de acuerdo con genética clásica se consideran animales de origen natural.

Como se usa en el presente documento, un "heterólogo" se define en relación con una secuencia génica referenciada predeterminada. Por ejemplo, con respecto a una secuencia génica estructural, un promotor heterólogo se define como un promotor que no aparece de forma natural adyacente al gen estructural referenciado, pero que se posiciona por manipulación en laboratorio. De forma similar, un gen heterólogo o segmento de ácido de ácido nucleico se define como un gen o segmento que no aparece de forma natural adyacente al promotor referenciado y/o elementos potenciadores.

"Elemento regulador transcripcional" se refiere a una secuencia polinucleotídica que activa la transcripción sola o en combinación con una o más secuencias de ácido nucleico adicionales. Un elemento regulador transcripcional puede, por ejemplo, comprender uno o más promotores, uno o más elementos de respuesta, uno o más elementos reguladores negativos y/o uno o más potenciadores.

Como se usa en el presente documento, un "sitio de reconocimiento de factor de transcripción" y un "sitio de unión de factor de transcripción" se refiere a una secuencia o secuencias polinucleotídicas o motivo o motivos de secuencia que se identifican como sitios para la interacción específica de secuencia de uno o más factores de

transcripción, tomando frecuentemente la forma de unión de ADN-proteína directa, típicamente, pueden identificarse sitios de unión a factor de transcripción por huella de ADN, ensayos de desplazamiento de movilidad en gel y similares y/o pueden predecirse basándose en motivos de secuencia consenso conocidos o por otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Como se usa en el presente documento la expresión

5 “unido operativamente” se refiere a un engarce de dos o más polinucleótidos o dos o más secuencias de ácido nucleico en una relación funcional. Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o secuenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se unen están típicamente contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones

10 codificantes de proteínas, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, puesto que los potenciadores actúan generalmente cuando están separados del promotor por varias kilobases y las secuencias intrónicas pueden ser de longitudes variables, algunos elementos polinucleotídicos pueden unirse operativamente pero no ser contiguos.

“Unidad transcripcional” se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende al menos un primer gen estructural unido operativamente al menos a una primera secuencia promotora de acción en cis y opcionalmente

15 unido operativamente a una o más secuencias de ácido nucleico de acción en cis distintas necesarias para transcripción eficaz de las secuencias génicas estructurales y al menos un primer elemento regulador distal según se pueda requerir para la transcripción de desarrollo y específica de tejido apropiada de la secuencia de gen estructural posicionada estructuralmente bajo el control del promotor y/o elementos potenciadores, así como cualquier secuencia en cis adicional que sea necesaria para transcripción y traducción eficaz (por ejemplo, sitio o

20 sitios de poliadenilación, secuencia o secuencias de control de estabilidad de ARNm, etc.).

Como se ha observado anteriormente, la presente invención se refiere en general a composiciones y procedimientos para usar las composiciones, por ejemplo en la terapia y diagnóstico de cáncer, tal como tumor malino hematológico. Ciertas composiciones ilustrativas descritas en el presente documento incluyen polipéptidos tumorales relacionados con tumor malino hematológico, polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, agentes de unión tales como

25 anticuerpos, células presentadoras de antígenos (APC) y/o células del sistema inmune (por ejemplo, linfocitos T). Una “proteína tumoral relacionada con tumor maligno hematológico”, como se usa la expresión en el presente documento, se refiere en general a una proteína que se expresa en células tumorales relacionadas con tumor maligno hematológico a un nivel que es al menos dos veces, y preferentemente al menos cinco veces, mayor que el nivel de expresión en un tejido normal, según se determina usando un ensayo representativo proporcionado en el

30 presente documento. Ciertas proteínas tumorales relacionadas con tumor maligno hematológico son proteínas tumorales que reaccionan de forma detectable (dentro de un inmunoensayo, tal como un ELISA o transferencia de Western) con antisuero de un paciente aquejado de tumor maligno hematológico.

#### 4.28 Equivalentes funcionales biológicos

Pueden realizarse cambios y modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y péptidos de la presente invención y obtener aún una molécula funcional que codifique un péptido con características deseables u obtener aún una construcción genética con la especificidad de expresión y/o propiedades deseables. Puesto que con frecuencia es deseable introducir una o más mutaciones en una secuencia polinucleotídica específica, pueden emplearse varios medios para introducir mutaciones en una secuencia polinucleotídica o peptídica conocida por los expertos en la materia para la preparación de secuencias heterólogas que pueden introducirse en la célula o especie animal seleccionada. En ciertas circunstancias, la secuencia peptídica codificada resultante se altera por esta mutación o, en otros casos, la secuencia de péptido no se cambia por una o más mutaciones en el polinucleótido codificante. En otras circunstancias, se introducen uno o más cambios en las regiones promotoras y/o potenciadoras de las construcciones polinucleotídicas para alterar la actividad o especificidad de los elementos de expresión y alterar de este modo la expresión del segmento de ácido nucleico terapéutico heterólogo situado operativamente

45 bajo el control de los elementos.

Cuando es deseable alterar la secuencia de aminoácidos de uno o más de los péptidos heterólogos codificados por la construcción de expresión para crear moléculas de una segunda generación equivalente, o incluso una mejorada, los cambios de aminoácidos pueden conseguirse cambiando uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante, de acuerdo con la Tabla 1.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituir a otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Puesto que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de secuencia de aminoácidos en una secuencia de proteína y, por supuesto, su secuencia codificante de ADN

50 subyacente y no obstante obtener una proteína con propiedades similares. Se contempla por lo tanto por los inventores que pueden realizarse diversos cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones desveladas, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos, sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica.

Tabla 1

Aminoácidos		Codones					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU	
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU			
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU			
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG			
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU			
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU	
Histidina	His	H	CAC	CAU			
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU		
Lisina	Lys	K	AAA	AAG			
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG				
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU			
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU	
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG			
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU	
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU	
Triptófano	Trp	W	UGG				
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU			

Al realizar tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de aminoácidos al conferir función biológica interactiva en una proteína generalmente se entiende en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982, incorporado en el presente documento por referencia). Se acepta que el carácter hidropático relativo de los aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. Se ha asignado a cada aminoácido un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y características de carga (Kyte y Doolittle, 1982), estos son: isoleucina (+ 4,5), valina (+ 4,2), leucina (+ 3,8), fenilalanina (+ 2,8); cisteína/cistina (+ 2,5); metionina (+ 1,9), alanina (+ 1,8); glicina (- 0,4); treonina (- 0,7), serina (- 0,8); triptófano (- 0,9); tirosina (- 1,3), prolina (- 1,6); histidina (- 3,2); glutamato (- 3,5); glutamina (- 3,5); aspartato (- 3,5); asparagina (- 3,5); lisina (- 3,9); y arginina (- 4,5).

Se conoce en la técnica que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y aún dan como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, aún obtienen una proteína biológica funcionalmente equivalente. Al realizar tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de  $\pm 2$ , se prefieren particularmente los que están dentro de  $\pm 1$  y se prefieren aún más particularmente los que están dentro de  $\pm 0,5$ . También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente basándose en hidrofilia. La Patente de Estados Unidos 4.554.101, incorporada en el presente documento por referencia, indica que la hidrofilia media local mayor de una proteína, gobernada por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la Patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a restos de aminoácidos: arginina (+ 3,0); lisina (+ 3,0); aspartato (+ 3,0  $\pm$  1); glutamato (+ 3,0  $\pm$  1); serina (+ 0,3); asparagina (+ 0,2); glutamina (+ 0,2); glicina (0); treonina (- 0,4); prolina (- 0,5  $\pm$  1); alanina (- 0,5); histidina (- 0,5); cisteína (- 1,0); metionina (- 1,3); valina (- 1,5); leucina (- 1,8); isoleucina (- 1,8); tirosina (- 2,3); fenilalanina (- 2,5); triptófano (- 3,4). Se entiende que puede sustituir un aminoácido a otro que tenga un valor de hidrofilia similar y obtener aún una proteína biológicamente equivalente y, en particular, inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere a la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de  $\pm 2$ , se prefieren particularmente los que están dentro de  $\pm 1$  y se prefieren aún más particularmente los que están dentro de  $\pm 0,5$ .

Como se ha descrito anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan por lo tanto en general en la similitud relativa de los sustituyentes de cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofilia, carga, tamaño y similares. Se conocen bien por los expertos en la materia sustituciones ejemplares que tienen en

consideración varias de las anteriores características e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Se definen aspectos de la invención en los párrafos numerados a continuación:

- 5 1. Un polinucleótido aislado como se expone en SEC ID N°: 1-3, 5, 7, 9, 11, 13-14, 16-17, 19-20, 22-25, 27-28, 30-31, 33 - 34, 36, 38-39, 41-42, 44, 46-47, 49, 51, 53, 55, 57, 59-60, 62, 64-65, 67-70, 72-73, 75, 77-81, 83, 85-86, 88-100, 102-103, 105-106, 108, 110-113, 115-116, 118 ó 124 codificando dicho polinucleótido un polipéptido o un fragmento inmunogénico del mismo.
- 10 2. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido del párrafo 1 unido operativamente a una secuencia de control de la expresión.
3. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de acuerdo con el párrafo 2.
4. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido o fragmento inmunogénico del mismo codificado por un polinucleótido del párrafo 1.
5. El inmunoconjugado del párrafo 4, en el que el anticuerpo se une a una molécula efectora.
- 15 6. El uso, en la preparación de un medicamento, de un inmunoconjugado de acuerdo con el párrafo 4 como un principio activo en una composición para tratar cáncer.
7. El procedimiento del párrafo 6, en el que el cáncer es células de mieloma múltiple.
8. El procedimiento del párrafo 6, en el que el cáncer es leucemia linfocítica crónica.
9. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 35, 37, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 61, 63, 66, 71, 74, 76, 82, 84, 20 87, 101, 104, 107, 109, 114, 117 ó 119-121.
10. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido del párrafo 9 o un fragmento inmunogénico del mismo.
11. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo como se expone en el párrafo 10.
12. El inmunoconjugado del párrafo 11, en el que el anticuerpo se liga a una molécula efectora.
- 25 13. El inmunoconjugado del párrafo 12, en el que la molécula efectora es un resto terapéutico.
14. El uso, en la fabricación de un medicamento, de un inmunoconjugado de acuerdo con el párrafo 11 como un principio activo en una composición para tratar cáncer.
15. El procedimiento del párrafo 14, en el que el cáncer es mieloma múltiple.
16. El procedimiento del párrafo 14, en el que el cáncer es leucemia linfocítica crónica.

## 30 5. Ejemplos

### 5.1 EJEMPLO 1 – IDENTIFICACIÓN DE POLINUCLEÓTIDOS ANTIGÉNICOS RELACIONADOS CON TUMOR MALIGNO HEMATOLÓGICO.

Este ejemplo ilustra la identificación de polinucleótidos antigénicos relacionados con tumor maligno hematológico de linfomas no de Hodgkin.

35 Se aislaron polinucleótidos antigénicos relacionados con tumor maligno hematológico por sustracción basada en PCR. Se preparó ARNm PoliA de linfomas no de Hodgkin de linfocitos T, linfomas no de Hodgkin de linfocitos B y tejidos normales. Se construyeron seis bibliotecas de ADNc, se sustrajeron por PCR y se analizaron. Se construyeron dos bibliotecas usando grupos de tres ARNm de linfoma no de Hodgkin de linfocitos T (denominadas en el presente documento bibliotecas TCS). Se construyeron otras dos usando grupos de tres ARNm de linfoma no de Hodgkin de linfocitos B (denominadas en el presente documento bibliotecas BCNHL). Se construyeron otras dos bibliotecas usando un grupo de dos ARNm de linfoma de Hodgkin (denominadas en el presente documento bibliotecas HLS). Se realizó síntesis de ADNc, hibridación y amplificación por PCR de acuerdo con el manual de usuario de Clontech (PCR-Select cDNA Subtraction), con los siguientes cambios: 1) se restringió ADNc con una mezcla de enzimas, incluyendo *MscI*, *PvuII*, *StuI* y *DraI*, en lugar de la enzima sencilla *RsaI*, y 2) la relación de ADNc de ensayo a controlador se aumentó en las etapas de hibridación (a 76: 1) para proporcionar una sustracción más rigurosa.

Las dos bibliotecas TCS se sustrajeron de forma independiente con diferentes grupos de ADNc controladores. El controlador N° 1 contenía ADNc preparado a partir de tejidos normales específicos (ganglio linfático, médula ósea, linfocitos T, corazón y cerebro) y esta sustracción generó la biblioteca TCS-D1 (biblioteca sustraída de linfoma no de Hodgkin de linfocitos T con controlador N° 1). El controlador N° 2 contenía tejidos normales no específicos (colon, intestino grueso, pulmón, páncreas, médula espinal, músculo esquelético, hígado, riñón, piel y cerebro), y esta sustracción generó la biblioteca TCS-D2 (biblioteca de sustracción de linfoma no de Hodgkin de linfocitos T con controlador N° 2).

De forma similar, las dos bibliotecas BCNHL se sustrajeron de forma independiente con diferentes grupos de ADNc controladores. El controlador N° 1 contenía ADNc preparado a partir de tejidos normales específicos (ganglio linfático, médula ósea, linfocitos B, corazón y cerebro) y esta sustracción generó la biblioteca BCNHL/D1 (biblioteca sustraída con linfoma no de Hodgkin de linfocitos B con el controlador N° 1). El controlador N° 2 contenía tejidos normales no específicos (cerebro, pulmón, páncreas, médula espinal, músculo esquelético, colon, bazo, intestino grueso y PBMC) y esta sustracción generó la biblioteca BCNHL/D2 (biblioteca de sustracción de linfoma no de

Hodgkin de linfocitos B con controlador N° 2).

Las dos bibliotecas HLS se sustrajeron de forma independiente con diferentes grupos de ADNc controladores. El controlador N° 1 contenía ADNc preparado a partir de tejidos normales específicos (ganglio linfático, médula ósea, linfocitos B y pulmón) y esta sustracción generó HLS-D1 (biblioteca de sustracción de linfoma de Hodgkin con controlador N° 1). El controlador N° 2 contenía tejidos normales no específicos (colon, intestino grueso, pulmón, páncreas, médula espinal, músculo esquelético, hígado, riñón, piel y cerebro) y este generó la biblioteca HLS-D2 (biblioteca de sustracción de linfoma de Hodgkin con controlador N° 2).

Para analizar la eficacia de la sustracción, se amplificó por PCR actina (un gen constitutivo) a partir de diluciones de muestras de PCR sustraídas así como no sustraídas. Además, la complejidad y redundancia de cada biblioteca se caracterizó secuenciando 96 clones de cada una de las bibliotecas de sustracción de PCR (TCS-D1 TCS-D2, BCNHL/D1, BCNHL/D2, HLS-D1 y HLS-D2). Estos análisis indicaron que las bibliotecas están enriquecidas con respecto a genes sobreexpresados en tejidos de leucemia y específicamente muestras de linfoma no de Hodgkin de linfocitos T y linfocitos B y linfoma de Hodgkin M.

Después de amplificación por PCR, los ADNc se clonaron en el vector plasmídico pCR2.1-TOPO (Invitrogen).

Las secuencias obtenidas a partir de estos análisis se examinaron frente a secuencias conocidas en las bases de datos disponibles públicamente usando la publicación BLAST 2.0. Los parámetros de BLAST por defecto usados fueron los siguientes: PARÁMETROS DE HUECO: hueco abierto = 0, hueco extendido = 0; PARÁMETROS DE SALIDA: expectativa = 10,0, umbral = 0, número de alineamientos = 250; para BLASTN, los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: emparejamiento erróneo = - 3, recompensa = 1, tamaño de palabra = 0. Los alineamientos se presentaron por pares, con un porcentaje de identidad de ventana = 22. Todas las bases de datos de proteínas y nucleótidos y proteínas disponibles se examinaron, incluyendo, PIR, SwissPROT, GenBank, Mouse EST, Human EST, Other EST, secuencias de alto rendimiento y repeticiones humanas y bases de datos de solicitud de patente y patentes publicadas.

A partir de éstas, se identificaron varias secuencias únicas que representan nuevas secuencias polinucleotídicas que no se habían descrito previamente en GenBank y otras bases de datos de secuencias. Se identificaron varias otras secuencias que parecían contener homología significativa con una o más secuencias previamente identificadas en las bases de datos, aunque se describieron solamente como clones de ADNc o genómicos y no tenían función conocida. Las secuencias restantes correspondían a genes conocidos. Los clones obtenidos a partir de este análisis se resumen en las Tablas 2-6 en la solicitud relacionada USSN 9/796.692.

## 5.2 EJEMPLO 2 – ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADNc SUSTRÁIDAS POR ANÁLISIS DE MICROSERIES

Se analizaron secuencias de ADNc sustraídas por análisis de microseries para evaluar su expresión en neoplasias hematológicas y tejidos normales. Usando este enfoque, las secuencias de ADNc se amplificaron por PCR y sus perfiles de expresión de ARNm en tumores malignos y tejidos normales se examinaron usando tecnología de microseries de ADNc esencialmente como se ha descrito (Shena y col, 1995).

Brevemente, los clones identificados de las bibliotecas de ADNc sustraído se inmovilizaron y se dispusieron sobre portaobjetos de vidrio como réplicas múltiples en portaobjetos de microserie y los portaobjetos se hibridaron con dos conjuntos diferentes de sondas, correspondiendo cada localización en el portaobjetos de microserie a un clon de ADNc único (pueden disponerse hasta 5.500 clones en un portaobjetos sencillo o microplaca). Cada microplaca se hibrida con un par de sondas de ADNc que están marcadas con fluorescencia con Cy3 y Cy5, respectivamente. El conjunto de sondas derivado de las neoplasias hematológicas se marcó con Cy3, mientras que el otro conjunto de sondas derivado de un grupo de tejidos normales se marcó con Cy5. Típicamente, se usó 1 µg de ARN poliA<sup>+</sup> para generar cada sonda de ADNc. Después de la hibridación, las microplacas se exploraron y la intensidad de fluorescencia se registró para canales tanto de Cy3 como de Cy5. La diferencia en intensidades (es decir, relaciones Cy3/Cy5) después de hibridación con ambos conjuntos de sondas proporcionaron la información sobre el nivel de expresión relativo de cada secuencia de ADNc inmovilizada en el portaobjetos en tejidos tumorales frente a normales. Existen múltiples etapas de control de calidad incorporadas. En primer lugar, la calidad de la sonda se controla usando un panel de genes expresados de forma ubicua. En segundo lugar, la placa de control también puede incluir fragmentos de ADN de levadura cuyo ARN complementario puede añadirse a la síntesis de sonda para medir la calidad de la sonda y la sensibilidad del análisis. Esta metodología proporciona una sensibilidad de 1 en 100.000 copias de ARNm y la reproducibilidad de la tecnología puede asegurarse incluyendo elementos de ADNc de control duplicados en diferentes localizaciones.

El análisis de clones sustraídos de tumor maligno hematológico por análisis de microseries en una diversidad de microplacas de microserie identificó las secuencias expuestas en SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 668, de la solicitud relacionada USSN 09/796.692 como sobreexpresadas al menos dos veces en neoplasias hematológicas frente a tejidos normales.

## 5.3 EJEMPLO 3 - COMPOSICIONES POLINUCLEOTÍDICAS Y POLIPEPTÍDICAS: BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS CLONES DE ADNc Y FASES ABIERTAS DE LECTURA IDENTIFICADAS POR HIBRIDACIÓN DE SUSTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE MICROSERIES

La Tabla 7 en la solicitud relacionada USSN 09/796.692 enumera las secuencias de los polinucleótidos obtenidos durante los análisis de la presente invención. Se muestran las 668 secuencias polinucleotídicas, junto con sus identificadores de nombre del clon, así como el número de serie y fecha de presentación de la solicitud de patente provisional de prioridad en la que se identificó por primera vez el clon.

- 5 La Tabla 8 en la solicitud relacionada USSN 09/796.692 identifica las fases abiertas de lectura potenciales obtenidas a partir de análisis de las secuencias de ADNc obtenidas en SEC ID N°: 1 - SEC ID N° 668 en la solicitud relacionada. Se muestran los identificadores de secuencia, el nombre del clon y la fase de traducción y los nucleótidos de comienzo y parada en la secuencia de ADN correspondiente usada para generar la secuencia polipeptídica de la fase abierta de lectura.
- 10 La Tabla 9 en la solicitud relacionada USSN 09/796.692 identifica un conjunto adicional de secuencias de ADNc relacionadas con tumor maligno hematológico particulares que se obtuvieron usando la biblioteca de sustracción y procedimientos de microserie como se ha descrito anteriormente. Estas secuencias, designadas SEC ID N° 2533 - SEC ID N°: 9597 en la solicitud relacionada, se muestran en la tabla junto con el nombre del clon original y el número de serie y fecha de presentación de la solicitud provisional de prioridad en la que se describió por primera vez el clon.

#### 5.4 EJEMPLO 4 - ANÁLISIS ADICIONAL DE CLONES DE ADNC Y ORF IDENTIFICADAS POR HIBRIDACIÓN DE SUSTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE MICROSERIE

Este ejemplo describe análisis de microserie de ADNc específicos de tejido y de tumor leucémico.

- 20 El análisis de microserie identifica muchos genes potenciales que sobreexpresan en tejidos/tumores específicos. Sin embargo, estos genes representan con frecuencia genes conocidos o genes que se descubre posteriormente por análisis de PCR en tiempo real que tienen un perfil de expresión más amplio. La presente divulgación describe análisis que combinan análisis de microseries (CorixArray) y comparaciones con bases de datos públicas para identificar y priorizar secuencias candidatas para análisis en tiempo real, permitiendo de este modo la identificación de secuencias con perfiles de expresión favorables de una manera más eficaz.

- 25 Los clones se ensayan con respecto a sobreexpresión en muestras de tumor de linfoma en comparación con tejidos normales usando microplaca de leucemia/linfoma de Corixa N° 3 (LyC3). Los clones analizados se seleccionaron originalmente de forma aleatoria de biblioteca sustraídas por PCR de linfoma: bibliotecas de linfoma no de Hodgkin de linfocitos B (BCNHL/D1 y BCNHL/D2; CID000153), bibliotecas de linfoma no de Hodgkin de linfocitos T (TCS-D1 y TCS-D2; CID000166); bibliotecas de linfoma de Hodgkin (HLS-D1 y HLS-D2, CID000204 y CID000275) y una biblioteca sustraída por PCR de leucemia de T8 generada por Clontech. Se dispusieron un total de 5184 clones: 30 2304 de bibliotecas BCNHL, 288 de bibliotecas TCS, 1344 de bibliotecas HLS y 960 de una biblioteca Clontech-T8. Además, se volvió a analizar una selección de 288 clones de las bibliotecas anteriores que se habían identificado de microplacas de leucemia/linfoma anteriores en LyC3.

- 35 Se amplifican insertos de ADNc para disposición mediante PCR usando cebadores específicos de vector. Las series se exploran con 43 pares de sondas. Se realiza análisis usando análisis computacional CorixArray. El análisis consistió en determinar la relación de la señal de hibridación media o mediana para un elemento particular (ADNc) usando dos conjuntos de sondas. La relación es un reflejo de la infra o sobre-expresión del elemento (ADNc) dentro de la población de sondas. Se preparan grupos de sondas para identificar elementos (ADNc) con alta expresión diferencial en el grupo de sondas n° 1. El grupo de sondas n° 1 típicamente consiste en 20 ARN tumorales, representando cada sonda un subconjunto de linfoma (por ejemplo, linfoma no de Hodgkin de linfocitos T, linfoma no de Hodgkin de linfocitos T y linfoma de Hodgkin). Las sondas en el grupo n° 2 incluyen 16 tejidos normales esenciales y no esenciales (véase, Figura 4). Se establece un umbral (sobreexpresión en veces en el grupo de sonda n° 1) en 3,0. Este umbral se establece para identificar elementos con sobreexpresión que podrían detectarse de forma reproducible basándose en la calidad de la microplaca. Las secuencias se seleccionan basándose 40 inicialmente en su análisis de CorixArray, específicamente basándose en sus valores de señal media 2.

Las secuencias que tienen una señal media  $2 < 0,1$  pueden considerarse secuencias con expresión baja/nula en tejidos normales. Las secuencias que tienen una señal media 2 entre 0,1 y 0,2 pueden considerarse clones con potencial para algo de expresión en tejidos normales. Las secuencias que tienen una señal media  $2 > 0,2$  pueden considerarse clones que tienen el potencial para tener expresión en algunos tejidos normales.

- 50 **5.5 EJEMPLO 5 - IDENTIFICACIÓN DE GENES CANDIDATOS CON EL MISMO PERFIL DE EXPRESIÓN TISULAR QUE CD20 Y CD52**

- Este ejemplo identifica genes específicos de tejido y tumor leucémico que tienen perfiles de expresión tisular similares a CD20 y CD52 (Figura 3). Se han usado anticuerpos contra estos dos marcadores para la terapia de neoplasias hematológicas y otras enfermedades asociadas con la expresión de estos marcadores, es decir, las 55 aprobados por la FDA Rituximab (Ab anti-CD20) y Campath (Ab anti-CD52). La similitud en expresión génica entre los genes candidatos de los inventores y CD20 y CD52 sugiere que los genes descritos también serán útiles como compuestos para el diagnóstico y terapia de neoplasias hematológicas y otras enfermedades cancerosas y no cancerosas asociadas con la expresión de uno o más de los antígenos descritos.



Se usó PCR en tiempo real para comparar los perfiles de expresión de los genes candidatos con los perfiles de expresión de CD20 y CD52. La Figura 8 ilustra la expresión de los genes candidatos en subconjuntos hematopoyéticos y neoplasias hematológicas. Los datos resumidos en el presente documento muestran que usando una combinación de las bibliotecas de ADNc sustraídas por PCR, análisis de microseries y PCR en tiempo real, es posible identificar genes expresados de forma diferencial en linfocitos B normales, linfomas, mieloma, leucemia linfocítica crónica y leucemia mieloide aguda.

**5.6 EJEMPLO 6 – ANÁLISIS DE LY1484 (SEC ID N°: 16-18 Y 120-121), UNO DE LOS GENES CON UN PERFIL DE EXPRESIÓN SIMILAR A CD20 Y CD52**

Este ejemplo ilustra el procedimiento típico usado para identificar antígenos para su uso como agentes terapéuticos, de diagnóstico, etc. y procedimientos preferidos para desarrollar agentes terapéuticos y de diagnóstico para enfermedades de leucemia/linfoma. En primer lugar, los genes candidatos altamente enriquecidos en células de leucemia/linfoma se identifican usando clonación de bibliotecas de sustracción de PCR. A continuación, las secuencias de ADNc sustraídas se analizan por análisis de microserie para evaluar su expresión en neoplasias hematológicas y tejidos normales. Puesto que el análisis de microseries con frecuencia identifica genes que representan genes conocidos o genes que se descubre posteriormente por análisis en tiempo real que tienen perfiles de expresión más amplios, el análisis de microseries se combina con comparaciones con bases de datos públicas para identificar y priorizar secuencias candidatas para análisis. A continuación, se usa PCR en tiempo real para analizar los perfiles de expresión en diversos subconjuntos hematológicos. En algunos casos, el análisis adicional se centra en antígenos con perfiles de expresión similares a agentes terapéuticos conocidos. Para estos genes, se usan programas de predicción estructural para identificar dominios transmembrana, se generan CTL específicos de antígeno usando sensibilización humana *in vitro* y se generan anticuerpos policlonales y monoclonales humanizados como reactivos para el diagnóstico y terapia de tumores malignos y trastornos autoinmunes asociados con expresión de antígenos.

Las secuencias de clon de biblioteca de sustracción de PCR Ly1484P coincidieron con el clon de GenBank KIAA1607 (N° de acceso XM033378, XM033379 y AB046827) y FJL00111 (N° de acceso AK024502). La sobreexpresión de Ly1484 se documentó por análisis de microseries y PCR en tiempo real. Ly1484P se sobreexpresa en neoplasmas de linfocitos B, mientras que la expresión en tejidos normales se restringe a linfocitos B normales.

Se obtuvo una secuencia de longitud completa de Ly1484P candidato usando la base de datos de GenBank. Se mapeó Ly1484P en el cromosoma humano 10. Existe una versión tanto corta como larga de Ly1484P (versión larga - SEC ID N°: 120; versión corta - SEC ID N°: 121). El análisis de TMpred de Ly1484P indica que esta proteína contiene un dominio transmembrana. Usando el programa TSITES, también se han identificado epítopos auxiliares T (Figuras 7 y 8). Se han generado polipéptidos y se usan para generar anticuerpos que son específicos para Ly1484P. Estos anticuerpos monoclonales humanizados pueden usarse (conjugados o no conjugados) para el diagnóstico y terapia de tumores malignos y trastornos autoinmunes asociados con expresión de Ly1484.

**5.7 EJEMPLO 7 – IDENTIFICACIÓN DE DOMINIOS TRANSMEMBRANA**

Se usaron programas de predicción estructural conocidos por los expertos en la materia para identificar dominios transmembrana en los antígenos candidato descritos en el presente documento.

Para Ly1728P, los restos aminoacídicos 6-22, 47-65, 227-243, y 228-245 de SEC ID N°: 2 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1732P, los restos aminoacídicos 60-76 y 55-76 de SEC ID N°: 4 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1888P, los aminoácidos 1-22, 3-21, 52-68, 254-273, 252-273 y 256-272 de SEC ID N°: 6 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1452P los aminoácidos 354-375, 355-377 y 425-441 de SEC ID N°: 10 (variante de corte y empalme 1) se identificaron como dominios transmembrana potenciales y los aminoácidos 354-375, 355-377 y 425-441 de SEC ID N°: 12 (variante de corte y empalme 2) se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Ly1462P, los aminoácidos 2-23, 3-21, 369-385, 976-999, 977-993 y 979-1000 de SEC ID N°: 15 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1484P, los aminoácidos 51-67, 322-338, 666-682, 736-752, 1078-1094, 24-43, 53-69, 118-136, 319-335, 730-752, 1586-1602, 48-69, 88-109, 114-135, 196-217, 300-321, 323-344, 389-410, 502-523, 659-680, 714-735, 1076-1097, 1158-1179 y 1321-1342 de SEC ID N°: 18 se identificaron como dominios transmembrana potenciales, los aminoácidos 10-86, 63-84, 118-139, 480-501, 562-583, 725-746, 70-86, 113-129, 134-156, 280-296, 481-497, 560 - 577, 653-674, 721-738, 734-752, 833-869, 879-895, 990-1006, 1023-1048, 1070-1087, 1112-1138, 1135-1170, y 1146-1170 de SEC ID N°: 120 se identificaron como dominios transmembrana potenciales, los aminoácidos 94-129, 102-123, 367-383, 394-423, 447-464 y 493-513 de SEC ID N°: 121 se identificaron como dominios

transmembrana potenciales.

Para Ly1486P, los aminoácidos 24-40 y 24-45 de SEC ID N°: 21 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

5 Para Ly1693P, los aminoácidos 47-63, 80-96, 114-130, 158-174, 207-223, 237-253, 289-305, 117-134,144-160,167-184,516-535, 44-65, 85-106, 111-132, 150-171, 204-225, 242-263 y 290-311 de SEC ID N°: 26 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1715P, los aminoácidos 38-54, 38-56 y 34-55 de SEC ID N°: 29 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

10 Para Ly1727P, los aminoácidos 68-100, 214-234, 304-320, 84-105, 217-238 y 302-323 de SEC ID N°: 32 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1905P, los aminoácidos 68-100, 214-234, 84-105, y 217-238 de SEC ID N°: 40 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1885P, los aminoácidos 218-234, 219-235, 626-654 y 219-240 de SEC ID N°: 35 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

15 Para Ly663S, los aminoácidos 22-38, 41-57, 60-76, 92-108, 242-258, 20-38,23-57,60-77,86-102,241-257, 14-35, 89-110, and 248-269 de SEC ID N°: 43 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly664S, los aminoácidos 11-27, 15-31, 74-93, 209-227, 8-29 y 67-88 de SEC ID N°: 45 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

20 Para Ly667S, los aminoácidos 13-31, 139-157, 184-202, 231-247, 329-351, 435-451, 473-490, 609-626, 685-705, 688-704, 7-28, 233-254 y 685-706 de SEC ID N°: 48 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly677S, los aminoácidos 149-165, 10-30,144-165, 7-28 y 144-165 de SEC ID N°: 54 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

25 Para Ly1891P, los aminoácidos 31-47, 66-82, 93-109, 128-144, 171-187, 205-221, 242-258, 31-48, 64-82, 94-111, 120-145, 170-187, 205-221, 244-266 y 29-50, 63-84, 93-114, 124-145, 168-189, 206-227 y 241-262 de SEC ID N°: 56 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para CD138, los aminoácidos 255-271, 4-21, 258-276, 6-27 y 256-277 de SEC ID N°: 58 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para CD22, los aminoácidos 688-704, 3-19, 29-46, 157-174, 185-201, 349-366, 386-406, 479-505, 688-709, 1-22, 159-180 y 689-710 de SEC ID N°: 61 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

30 Para CD79beta, los aminoácidos 161-177, 4-29, 59-78, 160-181, 4-25 y 161-180 de SEC ID N°: 66 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1454P, los aminoácidos 5-22,231-249, 7-28 y 425-446 de SEC ID N°: 74 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

35 Para Ly1485P, los restos aminoacídicos 2-19 de SEC ID N°: 76 se identificaron como un dominio transmembrana potencial.

40 Ly1500P, los restos aminoacídicos 10-31 y 327-344 de SEC ID N°: 80 (variante de corte y empalme 1) se identificaron como dominios transmembrana potenciales, los restos aminoacídicos 13-38, 71-92 y 388-405 de SEC ID N°: 82 (variante de corte y empalme 2) se identificaron como se identificaron como dominios transmembrana potenciales y los aminoácidos 25-46 y 341-359 de SEC ID N°: 84 (variante de corte y empalme 3) se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1516P, los aminoácidos 142-158, 177-193, 207-223, 238-254, 271-287, 142-158, 177-193, 207-223, 238-254 y 271-287 de SEC ID N°: 87 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1729P, los aminoácidos 420-436 431-437 y 412-433 de SEC ID N°: 101 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

45 Para Ly1859P, los restos aminoacídicos 128-144, 293-311, 408-425, 435-454, 465-483, 516-533, 290-311; 435-456 y 507-528 de SEC ID N°: 107 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly1866P, los aminoácidos 47-65 y 50-71 de SEC ID N°: 109 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly669S, los aminoácidos 489-505, 13-29, 38-57, 73-89,94-114,252-268, 307-324, 329-346, 489-509, 4-25, y 486-507 de SEC ID N°: 114 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

5 Para Ly672S, los aminoácidos 11-27, 284-300, 325-341, 345-361, 407-423, 7-28, 102-118, 174-198, 283-299, 325-341, 347-383, 403-423, 431-454, 473-492, 11-32, 286-307,322-343,345-366,404-425,430-451 y 469-490 de SEC ID N°: 117 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

Para Ly675S, los aminoácidos 154-170, 187-203, 428-444, 518-534, 846-862, 81-97, 155-172, 235-251, 374-391, 428-444, 477-195, 520-542, 539-573, 694-714, 807-823, 843-862,50-71, 77-98, 145-166, 518-539, 802-823 y 845-866 de SEC ID N°: 119 se identificaron como dominios transmembrana potenciales.

10 **5.8 EJEMPLO 8 – ANÁLISIS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA IDENTIFICAR ANTÍGENOS SOBREENSPRESADOS EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA Y MIELOMA MULTIPLE**

Se confirmó la sobreexpresión de antígenos candidatos en leucemia linfocítica crónica (CLL) y mieloma múltiple (MM) por PCR en tiempo real.

15 La PCR en tiempo real evalúa el nivel de acumulación de producto de PCR durante la amplificación (véase, por ejemplo, Gibson y col., Genome Research 6:995-1001 (1996); Heid y col., Genome Research 6:986-994 (1996)). La PCR en tiempo real permite la evaluación cuantitativa de niveles de ARNm en múltiples muestras. Brevemente, se extrae ARNm de tejido tumoral y normal y se prepara el ADNc usando técnicas convencionales. Se realiza PCR en tiempo real, por ejemplo, usando un instrumento Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA) 9700 Prism. Se diseñan cebadores coincidentes para genes de interés usando, por ejemplo, el programa de expresión de cebadores proporcionado por Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA). Las concentraciones óptimas de cebadores y sondas se determinan inicialmente por los expertos en la materia y las sondas y cebadores de control (por ejemplo,  $\beta$ -actina) se obtienen en el mercado de, por ejemplo, Perkin Elmer/Applied Biosystems (Foster City, CA). Para cuantificar la cantidad de ARN específico en una muestra, se genera una curva patrón usando un plásmido que contiene el gen de interés. Las curvas patrón se generan usando los valores de Ct determinados en la PCR en tiempo real, que se relacionan con la concentración de ADNc inicial usada en el ensayo. Generalmente son suficientes diluciones convencionales que varían de  $10^{-10^6}$  copias del gen de interés. Además, se genera una curva patrón para la secuencia de control. Esto permite la normalización del contenido de ARN inicial de una muestra de tejido a la cantidad de control para fines de comparación.

**Sumario de los resultados.**

Antígeno	CLL	MM
Ly1728P	no	sí
Ly1732P	sí	sí
Ly1888P	sí	no
Ly 1452P	sí	no
Ly1462P	sí	no
Ly1484P	no determinado	no determinado
Ly1486P	sí	no
Ly1677P	sí	no
Ly1682P	sí	no

(Continuación)

Antígeno	CLL	MM
Ly1693P	sí	sí
Ly1697P	sí	no
Ly1715P	sí	sí
Ly1727P	sí	sí
Ly1905P	sí	sí
Ly1885P	sí	sí
Ly663S	sí	sí
Ly664S	sí	sí
Ly667S	sí	sí
Ly677S	sí	sí
Ly1891P	no determinado	no determinado
CD138	no	sí
CD22	sí	no
CD79beta	sí	sí
Ly1450P	no determinado	no determinado
Ly1451P	sí	sí
Ly1454P	sí	no determinado
Ly1485P	no determinado	no determinado
Ly1500P	sí	no
Ly1516P	no determinado	no determinado
Ly1678P	sí	sí
Ly1680P	sí	no
Ly1686P	sí	no
Ly1687P	sí	no
Ly1706P	sí	sí
Ly1712P	sí	sí
Ly1729P	sí	sí
Ly1848P	sí	sí
Ly1859P	sí	no
Ly1866P	sí	sí
Ly1867P	sí	no
Ly1868P	sí	no
Ly1886P	sí	no
Ly669S	sí	sí
Ly672S	sí	sí
Ly675S	sí	sí

Estas secuencias pueden usarse convenientemente para diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades malignas que sobreexpresan estos genes, incluyendo mieloma múltiple, linfomas de linfocitos B y B-CLL. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos monoclonales humanizados para diagnóstico y terapia de trastornos asociados con expresión de antígeno sobreexpresados en neoplasias hematológicas.

5 **5.9 EJEMPLO 9 – ANÁLISIS DE SECUENCIA, ANÁLISIS DE EXPRESIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURALES DE OTROS ANTÍGENOS CON PERFILES DE EXPRESIÓN SIMILARES A CD20 Y CD52**

**Sumario de los resultados**

<b>Antígeno</b>	<b>Análisis de secuencia</b>
Ly1728P	FOAP-2 ("nuevo gen sobreexpresado en macrófagos")
Ly1732P	Factor de maduración de linfocitos B (BCM), superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral, miembro 17. BCM se agrupa con TALL-1, un miembro de la familia de TNF.
Ly1888P	antiproteína de apoptosis inducida por Fas (TOSO); se ha mostrado experimentalmente que se expresa en la superficie celular.
Ly1452P	antiproteína de apoptosis inducida por Fas (TOSO); se ha mostrado experimentalmente que se expresa en la superficie celular.
Ly1462P	Receptor del complemento de virus Epstein-Barr humano de tipo II
Ly1484P	KIAA1607 (secuencia de ADNc presente en GenBank).
Ly1486P	Fragmento Fc de IgE, receptor de baja afinidad II.
Ly1677P	nuevo
Ly1682P	nuevo
Ly1693P	Receptor de quimiocinas CXCR4
Ly1697P	nuevo
Ly1715P	Receptor de linfocitos NK de tipo lectina
Ly1727P	Variantes de corte y empalme del gen hpim-2 (homólogos del oncogén pim-2 de ratón). Se ha predicho que es una serina treonina quinasa con un papel en la proliferación celular.
Ly1905P	Variantes de corte y empalme del gen hpim-2 (homólogos del oncogén pim-2 de ratón). Se ha predicho que es una serina treonina quinasa con un papel en la proliferación celular.
Ly1885P	Una aparente forma de corte y empalme de la proteína de progresión del ciclo celular 8: una de una familia de proteínas implicadas en la restauración de la progresión del ciclo celular (bloqueando la detención en la fase G1).
Ly663S	Antígeno de superficie de leucocitos CD37
Ly664S	Proteína con función desconocida que comparte 30-40 % de identidad con diversas tiorredoxinas
Ly667S	Semaforina B (las semaforinas son una gran familia de proteínas secretadas y transmembrana; aparecen dominios sema en el receptor de factor de crecimiento de hepatocitos)
Ly677S	Receptor de superficie de leucocitos CD79A
Ly1891P	Receptor acoplado a proteína G huérfano (GPRC5D)
CD138	CD138
CD22	CD22
CD79beta	CD79beta
Ly1450P	nuevo (coincide con sec de GenBank FLJ23202; sin ORF)
Ly1451P	nuevo (coincide con sec de GenBank FLJ39358; sin ORF)
Ly1454P	nuevo (coincide con sec de GenBank FLJ40597; ORF)
Ly1485P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)

(continuación)

Ly1500P	Proteína BANK: proteína de almacén de linfocitos B con repeticiones de ankirina; un sustrato para fosforilación de tirosina tras estimulación del receptor de antígenos de linfocitos B.
Ly1516P	Antígeno relacionado con Rh CD47, una proteína asociada con integrina transductora de señal
Ly1678P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)
Ly1680P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)
Ly1686P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)
Ly1687P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)
Ly1706P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)
Ly1712P	nuevo
Ly1729P	Proteína sustrato de Lyn específico de célula hematopoyética 1 (HCLS1); medias repeticiones hs N-terminales con identidad significativa con un motivo de unión a ADN de hélice-giro-hélice; la mitad C-terminal es similar a dominios que actúan como sustratos para proteínas tirosina quinasas lo que sugiere que esta proteína puede estar implicada en la transducción de señal y regulación de expresión génica.
Ly1848P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)
Ly1859P	nuevo (coincide con sec de GenBank FLJ00140; ORF)
Ly1866P	Coincide con un gen en GenBank denominado "similar a la proteína hipotética PRO1722."
Ly1867P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)
Ly1868P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)
Ly1886P	nuevo (coincide con ADN genómico solamente)
Ly669S	molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM3)
Ly672S	Proteína relacionada con resistencia a cisplatino CRR9p
Ly675S	KIAA0906 (secuencias de proteínas/ADNc parciales presentes en GenBank).

### 5.10 EJEMPLO 10 – ANÁLISIS DE SECUENCIA DE LY1451

5 La secuencia de Ly1451 (SEC ID N°: 69-71 y 124) derivada de un clon de biblioteca de sustracción por PCR de linfoma se usó para consultar varias bases de datos públicas, incluyendo GenBank y GenSeq. No se detectaron coincidencias (>90 % de identidad) para los 51 pb 5' proximales lo que sugiere que esta secuencia puede contener un elemento repetido. Una búsqueda de BLASTN de la base de datos LifeSeq (Incyte) identificó un molde de 980 pb (molde n° 1076101.8; SEC ID N°: 124) que contenía los 240 pb de Ly1451. Este molde consistía en secuencias de 6 clones, de las que 2 (33 %) derivaban de bibliotecas de tejido inmune/hematológico. El molde n° 1076101.8 era parte de un grupo que contenía 11 moldes derivados de un total de 104 clones, de los que 12 (9 %) derivaron de bibliotecas de tejido inmune/hematológico.

15 Esta secuencia (SEC ID N°: 124) se usó para examinar bases de datos públicas adicionales pero no se obtuvieron secuencias adicionales. Sin embargo, estas búsquedas indican que esta secuencia es una secuencia retroviral endógena humana (HERV) que codifica polipéptidos correspondientes a partes de los genes de integrasa y envoltura. Una ORF sencilla con un sitio de inicio de la traducción ATG está contenida en la lectura directa de LS 1076101.8.

No se ha predicho que el polipéptido codificado por esta ORF (SEC ID N°: 124) tenga un dominio transmembrana.

### 5.11 EJEMPLO 11 – EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE LINFOMA LY1452 CODIFICADOS POR UN GEN ESPECÍFICO, LY1452, ASOCIADO CON LINFOMAS DE LEUCEMIAS DE LINFOCITOS B Y MIELOMAS MÚLTIPLES.

20 Se construyeron antígenos de Ly1452 expresados de forma recombinante para permitir purificación rápida y fácil de la proteína.

La fase abierta de lectura de Ly1452 se amplificó por PCR y se subclonó en un vector pET28 modificado con un marcador His en fase y se expresó de forma recombinante en *E. coli* (His-Ly1452: SEC ID N°: 10.482 (nt), SEC ID

Nº: 10.483 (proteína).

Expresión de Ly1452P en E. coli

La fase abierta de lectura de la región codificante LS se amplificó por PCR con los siguientes cebadores:

PDM-797      5' gtgtcacaatctacagtcaggcaggattctcc 3' Tm 64°C  
 (SEC ID Nº: 10.975)

PDM-799      5' gttatgtagcggccgcttatcatgttgctgcagag 3' Tm 67°C  
 (SEC ID Nº: 10.976)

Usando las siguientes condiciones:

- 5      10 µl de tampón de Herculasa 10X
- 1 µl dNTP 10mM
- 2 µl de cada oligo 10 µM
- 83 µl de agua estéril
- 1,0 µl ADN polimerasa Herculasa (Stratagene, La Jolla, CA)
- 10      50 ng de ADN
- 98°C 3 minutos
- 98°C 40 segundos      60°C 30 segundos      72°C 2 minutos X 10 ciclos
- 98°C 40 segundos      60°C 30 segundos      72°C 2 minutos 30 segundos X 10 ciclos
- 98°C 40 segundos      60°C 30 segundos      72°C 3 minutos X10 ciclos
- 98°C 40 segundos      60°C 30 segundos      72°C 3 minutos 30 segundos X10 ciclos
- 72°C 4 minutos

El producto de PCR se digirió con Xho I y se clonó en pPDM His (un vector pET28 modificado con un marcador His en fase en el extremo 5') que se había digerido con Eco72I y XhoI. Se confirmó la construcción a través de análisis de secuencia y se transformó en células BLR (DE3) pLysS y HMS 174 pLys S.

- 15      También se expresan proteínas recombinantes sin un marcador de histidina o con otros antígenos de linfoma. También se expresan en otros vectores, incluyendo otras construcciones de *E. coli*, baculovirus, levadura y vectores de expresión de mamíferos. Este antígeno recombinante puede usarse para realizar anticuerpos policlonales y monoclonales o usarse en ensayos inmunológicos.

**6. Referencias**

- 20      Patente de Estados Unidos 3.817.827.
- Patente de Estados Unidos 3.850.752.
- Patente de Estados Unidos 3.901.654.
- Patente de Estados Unidos 3.935.074.
- Patente de Estados Unidos 3.984.533.
- 25      Patente de Estados Unidos 3.996.345.
- Patente de Estados Unidos 4.034.074.
- Patente de Estados Unidos 4.098.876.
- Patente de Estados Unidos 4.235.877.
- Patente de Estados Unidos 4.376.110.
- 30      Patente de Estados Unidos 4.429.008.
- Patente de Estados Unidos 4.436.727.
- Patente de Estados Unidos 4.452.901.
- Patente de Estados Unidos 4.489.710.
- Patente de Estados Unidos 4.507.234.
- Patente de Estados Unidos 4.554.101.
- 35      Patente de Estados Unidos 4.569.789.
- Patente de Estados Unidos 4.603.112.
- Patente de Estados Unidos 4.625.014.
- Patente de Estados Unidos 4.638.045.
- Patente de Estados Unidos 4.671.958.
- 40      Patente de Estados Unidos 4.673.562.
- Patente de Estados Unidos 4.683.195.
- Patente de Estados Unidos 4.699.784.
- Patente de Estados Unidos 4.735.792.
- Patente de Estados Unidos 4.751.180.
- 45      Patente de Estados Unidos 4.769.330.

- Patente de Estados Unidos 4.777.127.  
 Patente de Estados Unidos 4.866.034.  
 Patente de Estados Unidos 4.873.088.  
 Patente de Estados Unidos 4.877.611.  
 5 Patente de Estados Unidos 4.897.268.  
 Patente de Estados Unidos 4.912.094.  
 Patente de Estados Unidos 4.935.233.  
 Patente de Estados Unidos 5.017.487.  
 Patente de Estados Unidos 5.075.109.  
 10 Patente de Estados Unidos 5.145.684.  
 Patente de Estados Unidos 5.151.254.  
 Patente de Estados Unidos 5.215.926.  
 Patente de Estados Unidos 5.240.856.  
 Patente de Estados Unidos 5.350.840.  
 15 Patente de Estados Unidos 5.359.681.  
 Patente de Estados Unidos 5.399.346.  
 Patente de Estados Unidos 5.399.363.  
 Patente de Estados Unidos 5.466.468.  
 Patente de Estados Unidos 5.472.869.  
 20 Patente de Estados Unidos 5.543.158.  
 Patente de Estados Unidos 5.552.157.  
 Patente de Estados Unidos 5.565.213.  
 Patente de Estados Unidos 5.567.434.  
 Patente de Estados Unidos 5.633.234.  
 25 Patente de Estados Unidos 5.641.515.  
 Patente de Estados Unidos 5.738.868.  
 Patente de Estados Unidos 5.741.516.  
 Patente de Estados Unidos 5.795.587.  
 Patente de Estados Unidos 5.811.128.  
 30 Patente de Estados Unidos 5.814.344.  
 Patente de Estados Unidos 5.820.883.  
 Patente de Estados Unidos 5.853.763.  
 Patente de Estados Unidos 5.874.265.  
 Patente de Estados Unidos 5.928.647.  
 35 Patente de Estados Unidos 5.942.252.  
 Patente de Estados Unidos 6.110.702.  
 Patente Europea Nº EP 0.345.242.  
 Patente de Gran Bretaña Nº GB 2.200.651.  
 40 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 89/01973.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 89/06280.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 91/02805.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 91/16116.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 92/07243.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 94/00153.  
 45 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 94/20078.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO/94/23701.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 95/17210.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 96/02555.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 96/06638.  
 50 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 96/30516.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 96/33739.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 97/24447.  
 Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nº WO 99/33488.  
 Aaroston y Todaro, J. Cell. Physiol., 72: 141-48, 1968.  
 55 Adelman y col., DNA, 2: 183, 1983.  
 Amin y col., Am. J. Pathol., 146: 344-56, 1995.  
 Akaza y col., "Expression of antitumor response. Role of attachment and viability of bacillus Calmette-Guerin to bladder cancer cells," Cancer, 72: 558-63, 1993.  
 American Type Culture Collection, Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 7ª ed., 1992.  
 60 Avrameas, "Natural autoantibodies: Self-recognition and physiological autoimmunity," In: Natural autoantibodies: Their Physiological Role and Regulatory Significance, Shoenfeld and Isenberg (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pág. 1-14, 1993.  
 Azuma y col., "Correlation Between Augmented Resistance to Influenza Virus Infection and Histological Changes in Lung of Mice Treated with Trehalose-6,6'-dimycolate," Journal of Biological Response Modifiers, 7: 473-82, 1988.  
 65 Bajorin y col., Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol., 7:A967, 1988.  
 Baker y col., "Ability of Monophosphoryl Lipid A To Augment the Antibody Response of Young Mice," Infection and



- Immunity, 56: 3064-66, 1988a.
- Baker y col., "Enrichment of Suppressor T Cells by Means of Binding to Monophosphoryl Lipid A," *Infection and Immunity*, 58: 726-31, 1990.
- 5 Baker y col., "Inactivation of Suppressor T-Cell Activity by Nontoxic Monophosphoryl Lipid A," *Infection and Immunity*, 56: 1076-83, 1988b.
- Baker y col., "Molecular structures that influence the immunomodulatory properties of the lipid A and inner core region oligosaccharides of bacterial lipopolysaccharides," *Infection and Immunity*, 62: 2257-69, 1994.
- Baker y col., "Structural Features That Influence the Ability of Lipid A and Its Analogs To Abolish Expression of Suppressor T Cell Activity," *Infection and Immunity*, 60: 2694-701, 1992.
- 10 Bakker y col., "Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes," *J. Exp. Med.*, 179: 1005, 1994.
- Banchereau y Steinman, *Nature*, 392: 245-51, 1998.
- Banerji y col., "Membrane lipid composition modulates the binding specificity of a monoclonal antibody against liposomes," *Biochim. Biophys. Acta.*, 689: 319-26, 1982.
- 15 Barnd y col., "Specific tumor histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7159, 1989.
- Barnoud y col., *Am. J. Surg. Pathol.*, 24: 830-36, 2000).
- Bartlett y Zbar, *J. Natl. Cancer Inst.*, 48: 1709, 1972.
- Bast y col., "BCG and Cancer," *N. Engl. J. Med.*, 290: 1413-20, 1974.
- 20 Bennett y col., "Endogenous Production of Cytotoxic Factors in Serum of BCG-Primed Mice by Monophosphoryl Lipid A, a Detoxified Form of Endotoxin," *Journal of Biological Response Modifiers*, 7: 65-76, 1988
- Berkner, *Biotechniques*, 6: 616-27, 1988.
- Berra y col., *Int. J. Cancer*, 36: 363-66, 1985.
- Berra y col., *J. Neurochem.*, 40: 777-82, 1983.
- 25 Bogoch, "Demonstration of serum precipitin to brain gangliosides," *Nature*, 183: 392-93, 1960.
- Bouchon y col., *Biochem. Internat.*, 10: 531-38, 1985.
- Bowen-Pope y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81: 2396-400, 1984.
- Bowness y col., "Clostridium perfringens enterotoxin is a superantigen reactive with human T cell receptors V beta 6.9 and V beta 22," *J. Exp. Med.*, 176: 893-96, 1992.
- 30 Brade y col., "An Artificial Glycoconjugate Containing the Bisphosphorylated Glucosamine Disaccharide Backbone of Lipid A Binds Lipid A Monoclonal Antibodies," *Infection and Immunity*, 61: 4514-17, 1993.
- Brichard y col., "The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas," *J. Exp. Med.*, 178: 489, 1993.
- Brodin y col., "Mouse monoclonal antibodies with specificity for the melanoma-associated ganglioside disialyllactosyl ceramide (GD3) also react with the structural analogue disialylparagloboside," *Biochim. Biophys. Acta.*, 837: 349-53, 35 1985.
- Brooks y col., *Clin. Exp. Immunol.*, 39: 477, 1980.
- Brown y col., *J. Biol Chem.*, 255: 4980-83, 1980.
- Burchell y col., *J. Immunol.*, 131: 508-13, 1983.
- 40 Bystryy y col., *Cancer*, 61: 1065, 1988.
- Cahan y col., "Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as ganglioside GD2," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 7629-33, 1982.
- Campbell y col., "Intercellular adhesion molecule-1 expression by bladder cancer cells: functional effects," *J. Urol.*, 151: 1385-90, 1994.
- 45 Campbell, en *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden y Von Knippenberg (eds.), Ámsterdam, Elsevier, pág. 75-83, 1984.
- Campbell y col., *Int. J. Cancer*, 78:182-88, 1998.
- Carr and Morrison, "A two-step mechanism for the interaction of Re lipopolysaccharide with erythrocyte membranes," *Rev. Infect. Dis.* 6: 497-508, 1984.
- 50 Carubia y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120: 500-04, 1984.
- Chang y col., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 22: 213, 1996.
- Chase y col., "Effect of Monophosphoryl Lipid A on Host Resistance to Bacterial Infection," *Infection and Immunity*, 53(3): 711-12, 1986.
- Chen y col., "Activation of Macrophages From Aging Mice by Detoxified Lipid A," *Journal of Leukocyte Biology*, 49: 55 416-22, 1991.
- Chen y col., *Cancer Res.*, 54: 1065-70, 1994.
- Cheng y col., "Bacillus Calmette-Gerin interacts with the carboxyl-terminal heparin bindings domain of fibronectin: implications for BCG-mediated antitumor activity," *J. Urol.*, 152: 1275-80, 1994.
- Cheresh y Klier, "Disialoganglioside GD3 distributes preferentially into substrate associated microprocesses on human melanoma cells during their attachment to fibronectin," *J. Cell. Biol.*, 102: 1-887-97, 1986.
- 60 Cheresh y col., "A monoclonal antibody recognizes an O-acetyl sialic acid in a human melanoma-associated ganglioside," *J. Biol. Chem.*, 259: 7453-59, 1984.
- Cheresh y col., "Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytolysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5155-59, 1985.
- 65 Cheresh y col., "Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins," *J. Cell. Biol.*, 102: 688-96, 1986.

- Cheresh y col., "Localization of gangliosides GD2 and GD3 in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5767-71, 1984.
- Cheung y col., "Detection of neuroblastoma cells in bone marrow using GD2 specific monoclonal antibodies," *J. Clin. Oncol.*, 4: 363-69, 1986.
- 5 Chu y Sharom, "Gangliosides inhibit T-lymphocyte proliferation by preventing the interaction of interleukin-2 with its cell surface receptors," *Immunology*, 79: 10-16, 1993.
- Cohen, *Science*, 259: 1691-92, 1993.
- Colcher y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 3199, 1987.
- Coligan y col., in *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, Wiley Interscience. Greene (ed.), 1998.
- 10 Coombes y col., *Vaccine*, 14: 1429-38, 1996.
- Coulie y col., "A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas," *J. Exp. Med.*, 180: 35, 1994.
- Deavin y col., *Mol. Immunol.*, 33: 145-55, 1996.
- DeBruijn y col., *Eur. J. Immunol.*, 21: 2963-70, 1991.
- 15 Dippold y col., "Immunohistochemical localization of ganglioside GD3 in human malignant melanoma, epithelial tumors and normal tissues," *Cancer Res.*, 45: 3699-705, 1985.
- Dippold y col., "Inflammatory response at the tumor site after systemic application of monoclonal anti-GD3-ganglioside antibody to patients with malignant melanoma," *Am. Assoc. Cancer Res.*, 978: 247, 1984.
- Dippold y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6115, 1980.
- 20 Dresser and Phillips, in *Immunopotentiality*, CIBA Foundation Symposium 18, Elsevier, Ámsterdam, p.3, 1973.
- Dwivedi y col., "Plasma lipid-bound sialic acid alterations in neoplastic diseases," *Experientia*, 46: 91-94, 1990.
- Elder, "Skin Cancer," *Cancer*, 75: 245-56, 1995.
- Elliott y col., "The D-Galactosamine Loaded Mouse and Its Enhanced Sensitivity to Lipopolysaccharide and Monophosphoryl Lipid A: A Role for Superoxide," *J. Immunol.*, 10: 69-74, 1991.
- 25 Euhus y col., *Cancer Immunol Immunother.*, 29:247-54, 1989.
- Fawwaz y col., *Patente de Registro de Invención Legal N° H819, solicitud n° 6-6-5.439*, 1990.
- Fischer, *Handb. Lipid Res.*, 6: 123-234, 1990.
- Fisher-Hoch y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86: 317-21, 1989.
- Fitzgerald, "Syphilis vaccine: up-regulation of immunogenicity by cyclophosphamide, Ribi adjuvant, and indomethacin confers significant protection against challenge infection in rabbits," *Vaccine*, 9: 265-72, 1991.
- 30 Fleischmann, Park y Hassan, "Fibronectin expression on surgical specimens correlated with the response to intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy," *J. Urol.*, 149: 268-71, 1993.
- Flexner y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 569: 86-103, 1989.
- Flexner y col., *Vaccine*, 8: 17-21, 1990.
- 35 Foster y col., *Cancer Res.*, 57: 3325-30, 1997.
- Fraizer y col., *Blood*, 86: 4704-06, 1995.
- Fredman y col., *Neurol. Res.*, 8: 123-26, 1986.
- Freimer y col., "Gangliosides elicit a T-cell independent antibody response," *J. Autoimmun.*, 6: 281-89, 1993.
- 40 Freudenberg y col., "ELISA for antibodies to Lipid A, Lipopolyasscharides and other hydrophobic antigens," *Infection*, 17: 322-24, 1989.
- Gaiger y col., *Blood*, 96: 1334, 2000
- Garg y Subbarao, "Immune Responses of Systemic and Mucosal Lymphoid Organs to Pnu-Immune Vaccine as a Function of Age and the Efficacy of Monophosphoryl Lipid A as an Adjuvant," *Infection and Immunity*, 60: 2329-36, 1992.
- 45 Gaugler y col., "Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a human melanoma by autologous cytotoxic T lymphocytes," *J. Exp. Med.*, 179: 921, 1994.
- Geffer y col., *Somatic Cell Genet.*, 3: 231-36, 1977.
- Gennaro y col., *Am. J. Ind. Med.*, 37: 275-82, 2000.
- 50 Gillard y col., "Antibodies against ganglioside GT3 in the sera of patients with type I Diabetes mellitus," *J. Immunol.*, 142: 3826-32, 1989.
- Gillis, *Nature*, 268: 154-56, 1977.
- Glynn, McCoy and Fefer, *Cancer Res.*, 28: 434-39, 1968.
- Goding, en *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª ed., Orlando, FL, Academic Press, pág. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
- 55 Goff y col., *Eur. J. Biochem.*, 130: 553-57, 1983.
- Grabarek y col., "Endotoxic Lipid A Interaction with Human Platelets," *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 8117-21, 1990.
- Graus y col., "Distribution of the ganglioside GD3 in the human nervous system detected by R24 mouse monoclonal antibody," *Brain Res.*, 324: 190-94, 1984.
- 60 Guzman y col., *Circulation*, 88: 2838-48, 1993a.
- Guzman y col., *Cir. Res.*, 73: 1202-07, 1993b.
- Hachida y col., *Transplant Proc.*, 22: 1663-70, 1990.
- Hachida y col., *Transplantation*, 56: 479-82, 1993.
- Harada y col., *Mol. Urol.*, 3: 357-364, 1999.
- 65 Hardings y col., "Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility complex molecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2740-44, 1991.

- Harel y col., *Cancer Res.*, 50: 6311, 1990.
- Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Helling y col., "Construction of Immunogenic GD3-conjugate vaccines," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 690: 396-97, 1993.
- 5 Hellstrom y col., "Strong anti-tumor activities of IgG 3 antibodies to a human melanoma-associated ganglioside," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1499-1502, 1985.
- Hirabayashi y col., "Syngeneic monoclonal antibody against melanoma antigen with interspecies cross-reactivity recognize GM3, a prominent ganglioside of B16 melanoma," *Biol. Chem.*, 260: 13328-33, 1985.
- Hirabayashi y col., "Reactivity of mouse monoclonal antibody M2590 against B16 melanoma cells with chemically synthesized GM3 ganglioside," *Biochim. Biophys. Acta*, 875:126-28, 1986.
- 10 Hirabayashi y col., *Jpn. J. Cancer Res.*, 78: 614-20, 1987.
- Hoon y col., "Gangliosides from melanoma immunomodulate response of T-cells to interleukin-2," *Cell Immunol.*, 4: 1111-19, 1988.
- Horibata and Harris, *Exp. Cell. Res.*, 60: 61, 1970.
- Horgan, "Total and lipid-bound sialic acid levels in sera from patients with Cancer," *Clin. Chim. Acta.*, 118: 327-31, 1982.
- 15 Houghten y col., "Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: A phase I trial in patients with malignant melanoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 1242-46, 1985.
- Houghton, "Cancer Antigens: Immune Recognition of Self and Altered Self," *J. Exp. Med.*, 180: 1.4, 1994.
- Hraba y col., "The Influence of Monophosphoryl Lipid A (MPL™) on Erythrocyte Autoantibody Formation," *Immunobiol.*, 189: 448-56, 1993.
- 20 Hunter y col., *Vaccine*, 9:250: 1991.
- Inoue y col., *Blood*, 88: 2267-78, 1996.
- Irie y Morton, "Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8694-98, 1986.
- 25 Irie y Ravindranath, "Gangliosides as targets for monoclonal antibody therapy of cancer," en *Therapeutic monoclonal antibodies*, Borrebaeck y Larrick (eds.), Stockton Press, Nueva York, p. 75-94, 1990.
- Irie y col., "Human antibody to OFA-I, a tumor antigen, produced in vitro by Epstein-Barr virus transformed human B-lymphoid cell lines," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 5666-70, 1982.
- Irie y col., "Melanoma gangliosides and human monoclonal antibody," en *Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy*, Metzgar y Mitchell (eds.), Alan R. Liss, Inc., Nueva York, pp. 115-126, 1989.
- 30 Ishioka y col., "MHC interaction and T cell recognition of carbohydrates and glycopeptides," *J. Immunol.*, 148: 2446-51, 1992.
- Jackson y col., "Induction of ICAM 1 expression on bladder tumours by BCG immunotherapy," *J. Clin. Pathol.*, 47: 309-12, 1994.
- 35 Johnson y Tomai, "A Study of the Cellular and Molecular Mediators of the Adjuvant Action of a Nontoxic Monophosphoryl Lipid A," *Adv. Exp. Med. Biol.*, 133: 567-79, 1988.
- Johnson y col., "Characterization of a nontoxic monophosphoryl lipid A," *Rev. Infect. Dis.*, 9: 512-16, 1987.
- Johnson y col., "Structural Characterization of Mono phosphoryl Lipid A Homologs Obtained from Salmonella minnesota Re595 Lipopolysaccharide," *J. Biol. Chem.*, 265: 8108-16, 1990.
- 40 Johnston y Bystry, "Effect of Cell Wall Skeleton and Monophosphoryl Lipid A Adjuvant on the Immunogenicity of a Murine B16 Melanoma Vaccine," *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 1240-45, 1991.
- Jones y col., *J Natl Cancer Inst*, 66: 249-54, 1981.
- Kabat y col., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, pág 647-669, 1991.
- 45 Kass-Eisler y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90: 11498-502, 1993.
- Katopodis y col., "Lipid-associated sialic acid test for the detection of human cancer," *Cancer Res.*, 42: 5270-75, 1982.
- Kawaguchi y col., "Characteristic mode of action of gangliosides in selective modulation of CD4 on human T lymphocytes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 158: 1050-55, 1989.
- 50 Kawakami y col., "Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3 S 15, 1994.
- Kawakami, Eliyahu, Sakaguchi, Robbins, Rivoltini, Yannelli, Appella y Rosenberg, "Identification of the immunodominant peptides of the Mart-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2 restricted tumor infiltrating lymphocytes," *J. Exp. Med.*, 180: 347-52, 1994.
- 55 Kensil y col., *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 199: 1423, 1991.
- Kloppel y col., "Glycolipid-bound sialic acid in serum: Increased levels in mice and humans bearing mammary carcinomas," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3011-13, 1977.
- Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-97, 1975.
- Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511-19, 1976.
- 60 Kolls y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 91: 215-19, 1994.
- Koscielak y col., "Glycolipid antigen and its antibody," *Immunochemistry*, 5: 441-55, 1968.
- Kovach y col., "Lipid IVA Inhibits Synthesis and Release of Tumor Necrosis Factor Induced by Lipopolysaccharide in Human Whole Blood Ex Vivo," *J. Exp. Med.*, 172: 77-84, 1990.
- Kwok y Higuchi, *Nature*, 339: 237-38, 1989.
- 65 Kyogashima y col., *Jpn. J. Cancer Res.*, 78: 1229-32, 1987.
- Ladisich y col., "Shedding of GD2 ganglioside by human neuroblastoma," *Int. J. Cancer*, 39: 73-76, 1987.

- Lamm y col., "A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guérin for transitional-cell carcinoma of the bladder," *N. Engl. J. Med.*, 325: 1205, 1991.
- Lengle y col., "Inhibition of the lectin-induced mitogenic response of thymocytes by glycolipids," *Cancer Res.*, 39: 817-922, 1979.
- 5 Liepkalns y col., *J. Neurochem.*, 36: 1959-65, 1981.
- Livingston y col., "The Serologic Response to Meth A Sarcoma Vaccines After Cyclophosphamide Treatment is Additionally Increased by Various Adjuvants," *The Journal of Immunology*, 135(2): 1505-09, 1985.
- Livingston y col., "Approaches to augmenting immunogenicity of the ganglioside GM2 in mice: purified GM2 is superior to whole cells," *J. Immunol.*, 138: 1524-29, 1987a.
- 10 Livingston y col., "Vaccines containing purified GM2 gangliosides elicit GM2 antibodies in melanoma patients," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2911-15, 1987b.
- Ljunggren y col., *Nature*, 346: 476-80, 1990.
- Lozzio y Lozzio, *Blood*, 45: 321-34, 1975.
- Madonna y Vogel, "Induction of Early-Phase Endotoxin Tolerance in Athymic (Nude) Mice, B-Cell-Deficient (xid) Mice, and Splenectomized Mice," *Infection and Immunity*, 53: 707-10, 1986.
- 15 Mahvi y col., *Immunology and Cell Biology*, 75: 456-60, 1997.
- Maratea y col., *Gene*, 40: 39-46, 1985.
- Masihi y col., "Effects of Nontoxic Lipid A and Endotoxin on Resistance of Mice to *Toxoplasma gondii*," *Journal of Biological Response Modifiers*, 7: 535-39, 1988
- 20 Melling y col., *J. Immunol.*, 117: 1267-74, 1976.
- Menssen y col., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 126: 226-32, 2000.
- Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-46, 1963.
- Miller y Esselman, "Modulation of immune response by antigen reactive lymphocytes after cultivation with gangliosides," *J. Immunol.*, 115: 839-43, 1975.
- 25 Minden, "Shared Antigens Between Animal and Human Tumors and Microorganisms," in *BCG in Cancer Immunotherapy*, Lamoureux, Turcotte y Portelance (eds.); pág. 73-81, 1976.
- Miotti y col., *Cancer Res.*, 65: 826, 1985.
- Mitchell y col., "Active specific immunotherapy of melanoma with allogeneic cell lysates: Rationale, results and possible mechanisms of action," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 690: 153-66, 1993.
- 30 Mitchell y col., "Active specific immunotherapy of melanoma: Phase I trial of allogeneic lysates and a novel adjuvant," *Cancer Res.*, 48: 5883-93, 1988.
- Mitchell y col., "Active-Specific Immunotherapy for Melanoma," *Journal of Clinical Oncology*, 8: 856-59, 1990.
- Miyake y col., *Cancer Res.*, 48: 6154-60, 1988.
- 35 Mooney y col., "Bacterial superantigen signaling via HLA class II on human B lymphocytes," *Mol. Immunol.*, 31: 675-81, 1994.
- Morrison y col., "Specific ganglioside binding to receptor sites on T lymphocytes that couple to ganglioside induced decrease of CD4 expression," *Life Sci.*, 45: 1219-24, 1989.
- Morton y Ravindranath, en *Cancer Medicine*, 3ª ed., Holland y col. (eds.), Lea y Febiger, Philadelphia, p. 967, 1993.
- 40 Morton y col., "Polyvalent Melanoma Vaccine Improves Survival of Patients with Metastatic Melanoma," *John Wayne Cancer Institute at Saint John's Hospital and Health Center, Santa Monica, California, reimpreso de Specific Immunotherapy of Cancer with Vaccines, Volumen 690 de Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993.
- Morton y col., *Ann. Surg.*, 216:463, 1992.
- Morton y col., en *Biological Function of Gangliosides*, *Progress in Brain Research*, Vol. 101, pág. 251-275, 1994.
- 45 Mosmann y Coffman, *Ann. Rev. Immunol.*, 7: 145-73, 1989.
- Munjal y col., "Combined measurement and significance of lipid-bound sialic acid and carcinoembryonic antigen in detection of human cancer," *Diagn. Immunol.*, 2: 36-43, 1984.
- Murphy y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8258-62, 1986.
- Myers y col., "Monophosphoryl Lipid A Behaves as a T-Cell-Independent Type 1 Carrier for Hapten-Specific Antibody Responses in Mice," *Infection and Immunity*, 63: 168-74, 1995.
- 50 Naiki y col., "Properties of antisera to ganglioside GM1 and Asialo GM1," *J. Immunol.*, 113: 84-93, 1974.
- Nair y col., *Nature Biotechnol.*, 16: 364-69, 1998.
- Natoli y col., "A murine monoclonal antibody detecting the ganglioside GM2: Characterization of cell surface reactivity," *Cancer Res.*, 46: 4116-20, 1986.
- Nonomura y col., *Hinyokika Kyo*, 45: 593-97, 1999.
- 55 Nudelman y col., "Characterization of a human melanoma-associated ganglioside antigen defined by a monoclonal antibody 4.2," *J. Biol. Chem.*, 257: 12752-56, 1982.
- Odean y col., "Involvement of Gamma Interferon in Antibody Enhancement by Adjuvants," *Infection and Immunity*, 58: 427-32, 1990.
- Oji y col., *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 194-204, 1999.
- 60 Old y col., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 101: 80-106, 1962.
- Pan y col., *Leukemia*, 14: 1634, 2000.
- Parker y col., *J. Immunol.*, 152: 163, 1994.
- Pascal y col., "Immunochemical studies on normal and Tay-Sachs' brain gangliosides," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121: 739-43, 1966.
- 65 Patek, Collins y Cohn, "Transformed cell lines susceptible or resistant to in vivo surveillance against tumorigenesis," *Nature*, 276: 510-11, 1978.

- Patmasariwat y col., *Leukemia*, 13: 891-900, 1999.
- Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª ed., Raven Press, pág. 243-47, 1993.
- Portoukalian y col., "Humoral immune response in disease-free advanced melanoma patients after vaccination with melanoma-associated gangliosides," *Int. J. Cancer*, 49: 893-99, 1991.
- 5 Portoukalian, "Alteration of gangliosides in plasma and red cells of human bearing melanoma tumors," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85: 916-20, 1978.
- Portoukalian, "Immunoregulatory activity of gangliosides shed by melanoma tumors," en *Gangliosides and Cancer*, Oettgen (ed.), Nueva York, VCH Publishers, pág. 207-16, 1989.
- Powell y Newman (eds.), "Vaccine Design (the subunit and adjuvant approach)," Plenum Press, NY, 1995.
- 10 Prokazova y col., "Sialylated lactosylceramides. Possible inducers of non-specific immunosuppression and atherosclerotic lesions," *Eur. J. Biochem.*, 171: 1-10, 1988.
- Pukel y col., "GD3, a prominent ganglioside of human melanoma: Detection and characterization of mouse monoclonal antibody," *J. Exp. Med.*, 155: 1133-47, 1982.
- 15 Qureshi y col., "Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the Lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*," *J. Biol. Chem.*, 257: 11808-15, 1985.
- Rabinovich y col., "Vaccine Technologies: View to the Future," *Science*, 265: 1401-02, 1994.
- Raines y Ross, *J Biol. Chem.*, 257: 5154-60, 1982.
- Rapport y Graf, "Immunochemical Reactions of Lipids," *Prog. Allergy*, 13: 273-331, 1969.
- 20 Ravindranath y Irie, en *Malignant Melanoma: Biology. Diagnosis, y Therapy*, Nathanson (ed.), Kluwer Acad., Boston, p. 17, 1988.
- Ravindranath y Morton, "Role of gangliosides in active immunotherapy with melanoma vaccine," *Int. Rev. Immunol.*, 7: 303, 1991.
- Ravindranath y col., "Human melanoma antigen O-acetylated Ganglioside GD3 is recognized by Cancer antennarius lectin," *J Biol. Chem.*, 263: 2079-86, 1988.
- 25 Ravindranath y col., "An epitope common to gangliosides O-acetyl GD3 and GD3 recognized by antibodies in melanoma patients after active specific immunotherapy," *Cancer Res.*, 49: 3891-97, 1989.
- Ravindranath y col., "Ganglioside GM3:GD3 Ratio as an Index for the Management of Melanoma," *Cancer*, 67: 3029-35, 1991.
- Ravindranath y col., "Efficacy of tumor cell vaccine after incorporating monophosphoryl lipid A (MPL) in tumor cell membranes containing tumor-associated ganglioside," *Experientia*, 50: 648-653, 1994a.
- 30 Ravindranath y col., "Attachment of Monophosphoryl Lipid A (MPL) to Cells and Liposomes Augments Antibody Response to membrane-bound Gangliosides," *Journal of Autoimmunity*, 7: 803-16, 1994b.
- Ravindranath y col., "Factors affecting the fine specificity and sensitivity of serum antiganglioside antibodies in ELISA," *J. Immunol. Methods*, 169: 257-72, 1994c.
- 35 Real y col., "Class I (unique) tumor antigens of human melanoma. Identification of a 90,000 dalton cell surface glycoprotein by autologous antibody," *J. Exp. Med.*, 160: 1219, 1984.
- Reeves y col., *Cancer Res.*, 56:5672-77, 1996.
- Reisfeld y col., *Melanoma Antigens and Antibodies*, p. 317, 1982.
- Ribi, "Beneficial modification of the endotoxin molecule," *J. Biol. Resp. Mod.*, 3: 1-9, 1984.
- 40 Ribi y col., "Lipid A and immunotherapy," *Rev. Infect. Dis.*, 6: 567-72, 1984.
- Ribi y col., "Modulation of humoral and cell mediated immune responses by a structurally established nontoxic lipid A," en *Immunobiology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins*, Szentivanji y Friedman (eds.), Plenum Press, Nueva York, pág. 407-420, 1986.
- Rickman y col., *Lancet* 337: 998, 1991.
- 45 Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems*, 15: 143-98, 1998.
- Rosenberg y col., *Ann. Surg.*, 210: 474, 1989.
- Rosenberg y col., *N. Engl. J. Med.*, 319: 1676, 1988.
- Rosenfeld y col., *Science*, 252: 431-34, 1991.
- Rothbard y Taylor, *EMBO J.*, 7: 93-100, 1988.
- 50 Rott y col., "Protection from experimental allergic encephalomyelitis by application of a bacterial superantigen," *Int. Immunol.*, 4: 347-53, 1992.
- Sato y col., "Cytoplasmic membrane-associated protein (CAP) isolated from *Streptococcus pyogenes*: as a new bacterial superantigen," *Microbiol. Immunol.*, 38: 139-47, 1994.
- Sato y col., *Science*, 273: 352, 1996.
- 55 Satoh y col., *Pathol. Int.*, 50: 458-71, 2000.
- Schuster y col., "Production of antibodies against phosphocholine, phosphatidylcholine, sphingomyelin, and lipid A by injection of liposomes containing lipid A," *J. Immunol.*, 122: 900-05, 1979.
- Schwab y col., "Superantigen can reactivate bacterial cell wall-induced arthritis," *J. Immunol.*, 150: 4151-59, 1993.
- 60 Shafer y Spitznagel, "Sensitivity of *Salmonella typhimurium* to polymorphonuclear granulocyte extracts: Role of lipid A," *Rev. Infect. Dis.*, 6: 577-81, 1984.
- Shepard y col., *J. Clin. Immunol.*, 11: 117-27, 1991.
- Sherwin y col., "The production of antisera to gangliosides from human nervous tissue," *Canad. J. Biochem.*, 42: 1640-48, 1964.
- Shimizu y col., *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 19: 158-63, 2000.
- 65 Shy y col., "Antibodies to GM1 and GD1b in patients with motor neuron disease with plasma cell dyscrasia," *Ann. Neurol.*, 25: 511-18, 1989.

- Siddiqui y col., *Cancer Res.*, 44: 5262-65, 1984.  
 Sidell y col., *Cancer Immunol Immunother*, 7: 151-55, 1979.  
 Sigma Cell Culture, Volumen 9, Número 2, 1993.  
 Skeiky y col., *Infection and Immun.*, 67: 3998-4007, 1999.
- 5 Slavín y Strober, *Nature*, 272: 624-26, 1977.  
 Spinsanti y col., *Leuk. Lymphoma*, 38: 611-19, 2000.  
 Stuess y Krüger, "Mammalian Cell Culture Media - Overview and Applications," *The Source (Sigma Cell Culture Technical and Product News)*, 9: 1-8, 1993.  
 Stoute y col. *New Engl. J. Med.*, 336: 86-91, 1997.
- 10 Svennerholm y col., "Tumor gangliosides as targets for active specific immunotherapy of melanoma in man," in *Biological Function of Gangliosides, Progress in Brain Research, Vol. 101*, 1994.  
 Tai y col., "Ganglioside GM2 as a human tumor antigen (OFA-I-1)," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 5392-96, 1983.  
 Takada y col., "Molecular and Structural Requirements of a Lipoteichoic Acid from *Enterococcus hirae* ATCC 9790 for Cytokine-Inducing, Antitumor, and Antigenic Activities," *Infection and Immunity*, 63: 57-65, 1995.
- 15 Takahashi y col., *J. Immunol.*, 140: 3244, 1988.  
 Tamaki y col., *Leukemia*, 13: 393-99, 1999.  
 Tamauchi y col., *Immunology*, 50: 605, 1983.  
 Tanamoto, "Dissociation of Endotoxic Activities in a Chemically Synthesized Lipid A Precursor after Acetylation," *Infection and Immunity*, 63: 690-92, 1995.
- 20 Tanamoto, "Free Hydroxyl Groups Are Not Required for Endotoxic Activity of Lipid A," *Infection and Immunity*, 62: 1705-09, 1994a.  
 Tanamoto, *FEBS Lett.*, 351: 325-29, 1994b.  
 Tautu y col., "Improved procedure for determination of serum lipid-associated sialic acid: Application for early diagnosis of colorectal cancer," *J. Natl. Cancer Inst.*, 80: 1333-37, 1988.
- 25 Thor y col., *Cancer Res.*, 46: 3118, 1986.  
 Thurin y col., "Proton NMR and fast-atom bombardment mass spectrometry analysis of the melanoma-associated ganglioside 9-O-acetyl GD3," *J. Biol. Chem.*, 260: 14556-563, 1985.  
 Timmerman y Levy, *Ann. Rev. Med.*, 50: 507-29, 1999.
- 30 Tomai y Johnson, "T Cell and Interferon- $\gamma$  Involvement in the Adjuvant Action of a Detoxified Endotoxin," *Journal of Biological Response Modifiers*, 8: 625-43, 1989.  
 Tomai y col., "The Adjuvant Properties of a Nontoxic Monophosphoryl Lipid A in Hyporesponsive and Aging Mice," *Journal of Biological Response Modifiers*, 6: 99-107, 1987.  
 Tsuchida y col., *J. Dermatol.*, 11: 129-38, 1984.
- 35 Tsuchida y col., "Gangliosides of Human Melanoma: Altered Expression in Vivo and in Vitro," *Cancer Research*, 47: 1278-81, 1987.  
 Tsuchida y col., "Gangliosides as tumor markers of human melanoma: biochemical and immunologic assays," en *New Horizons of Tumor Immunotherapy*, Torisu y Yoshida (eds.), pág. 315-325, 1989.  
 Tuting y col., *J. Immunol.*, 160: 1139-47, 1998.  
 Ulmer y col., *Science*, 259: 1745-49, 1993.
- 40 Vadhan-Raj y col., *J. Clin. Oncol.*, 6: 1636, 1988.  
 van der Bruggen y col., "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma," *Science*, 264: 716, 1991.  
 Verma y col., "Adjuvant Effects of Liposomes Containing Lipid A: Enhancement of Liposomal Antigen Presentation and Recruitment of Macrophages," *Infection and Immunity*, 60: 2438-44, 1992.
- 45 Vijayasaradhi y col., "The melanoma antigen gp75 is the human homologue of the mouse b (brown) locus gene product," *J. Exp. Med.*, 171: 1375, 1990.  
 Von Bultzingslowen, *Pneumologie*, 53: 266-75, 1999.  
 Vosika y col., *Cancer Immunol. Immunother.*, 18: 107, 1984.
- 50 Watson, Ralph, Sarkar y Cohn, "Leukemia viruses associated with mouse myeloma cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 66: 344, 1970.  
 Westrick y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 750: 141-48, 1983a  
 Westrick y col., *Cancer Res.*, 43: 5890-94, 1983b  
 Whisler y Yates, "Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I. Characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation," *J. Immunol.*, 125: 2106-12, 1980.
- 55 Wide y col., in *Radioimmunoassay Methods*, Kirkham y Hunter (eds.), E. y S. Livingstone, Edinburgo, 1970.  
 Wilschut, "Preparation and properties of phospholipid vesicles," en *Methodologie des liposomes appliquee a la pharmacologie et a la biologies cellulaire*, Leserman y Barbet (eds.), INSERM, París, pág. 1-10, 1982.  
 Yamaguchi y col., "Cell-surface antigens of melanoma recognized by human monoclonal antibodies," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 2416-20, 1987.
- 60 Yamamoto y col., "In vitro Augmentation of Natural Killer Cell Activity and Production of Interferon- $\alpha/\beta$  and  $-\gamma$  with Deoxyribonucleic Acid Fraction from *Mycobacterium bovis* BCG," *Jpn. J. Cancer Res.*, 79: 866-73, 1988.  
 Yeh y col., "A cell-surface antigen which is present in the ganglioside fraction and shared by human melanomas," *Int. J. Cancer*, 29: 269-75, 1982.
- 65 Yin y col., "Effect of Various Adjuvants on the Antibody Response of Mice to Pneumococcal Polysaccharides," *J. Biol. Resp. Modifiers*, 8: 190-205, 1989.  
 Yokoyama y col., "Immunochemical studies with gangliosides," *J. Immunol.*, 90: 372-80, 1963.

Zapata y col., Protein Eng., 8: 1057-62, 1995.  
Zitvogel y col., Nat. Med., 4: 594-600, 1998.

**REVINDICACIONES**

1. Uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 4 en la fabricación de un medicamento para tratamiento de leucemia linfocítica crónica (CLL) o mieloma múltiple (MM) en un sujeto mamífero.
- 5 2. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 4 para su uso en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (CLL) o mieloma múltiple (MM) en un sujeto mamífero.
3. El uso de la reivindicación 1 o el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 para el uso de la reivindicación 2, en el que la CLL o MM se asocia con sobreexpresión de BCMA.
- 10 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho anticuerpo es un fragmento Fab.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo es un fragmento Fv.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es un fragmento scFv.
- 15 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho anticuerpo comprende adicionalmente un resto terapéutico.
10. El uso de la reivindicación 9, en el que el resto terapéutico es un radionúclido.
11. El uso de la reivindicación 10, en el que el radionúclido es un miembro seleccionado del grupo que consiste en  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{111}\text{At}$  y  $^{212}\text{Bi}$ .
- 20 12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el sujeto mamífero es un ser humano.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la administración es intravenosa.
14. Un procedimiento *in vitro* para la detección de leucemia linfocítica crónica (CLL) o mieloma múltiple (MM) en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento:
  - 25 a. poner en contacto una muestra biológica obtenida del paciente con un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 4, por lo que dicho anticuerpo monoclonal forma un complejo con un polipéptido que comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 4;
  - b. detectar la cantidad de dicho complejo, detectando de este modo cáncer en dicho paciente.



# Descripción de Enfoque de Tecnología de Microplaca de Microseries

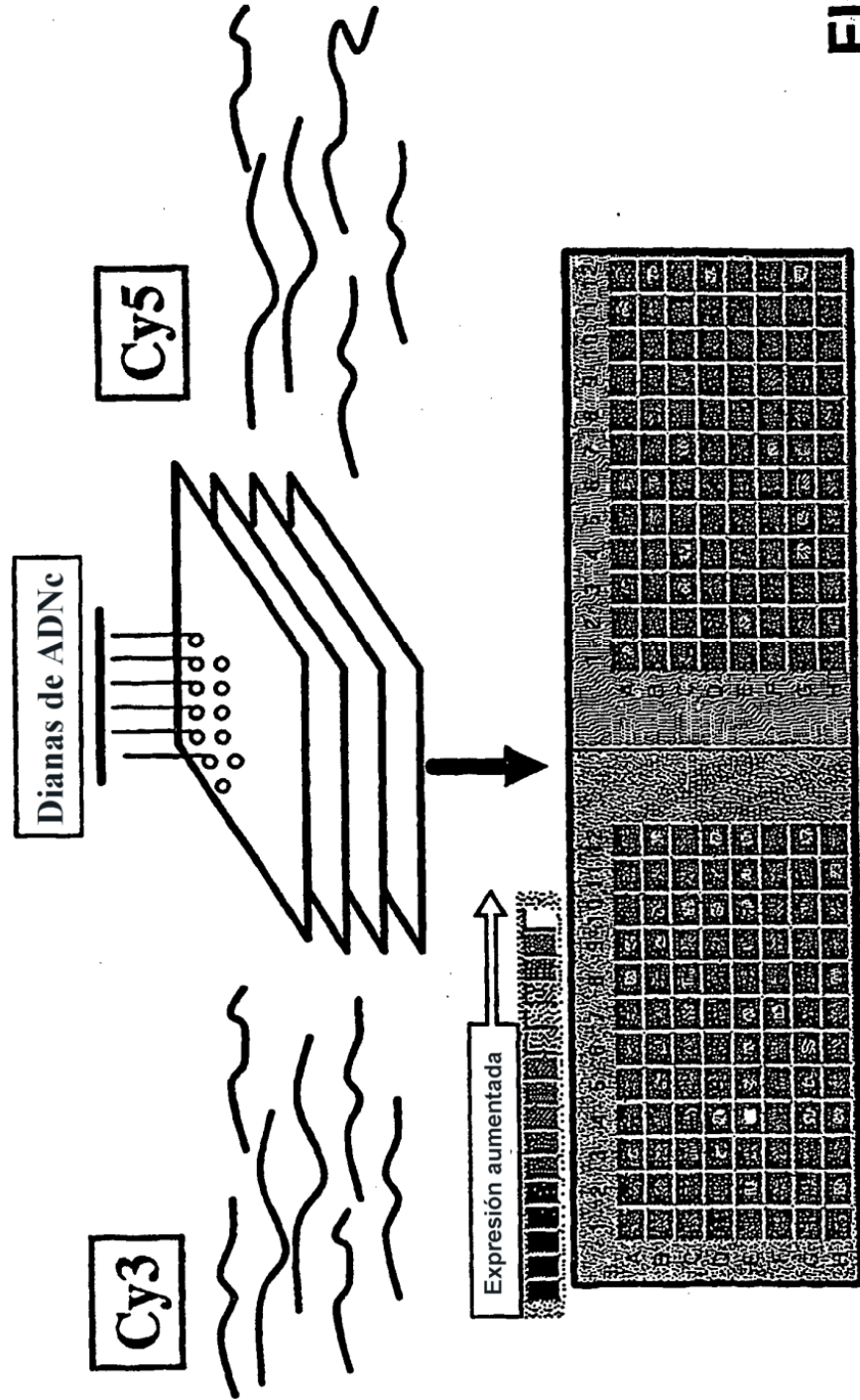
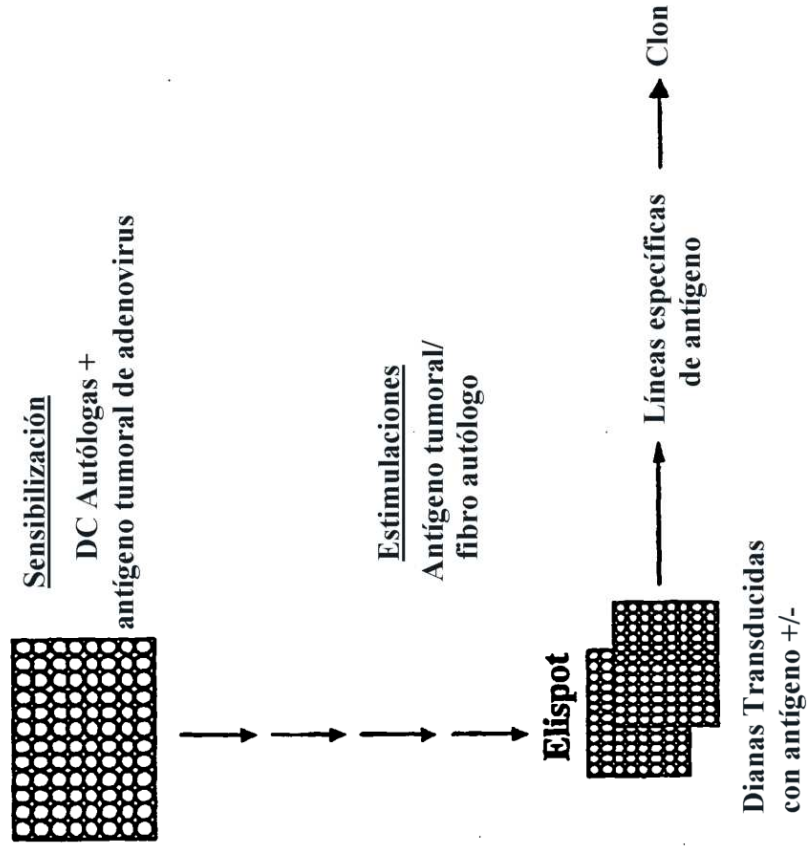


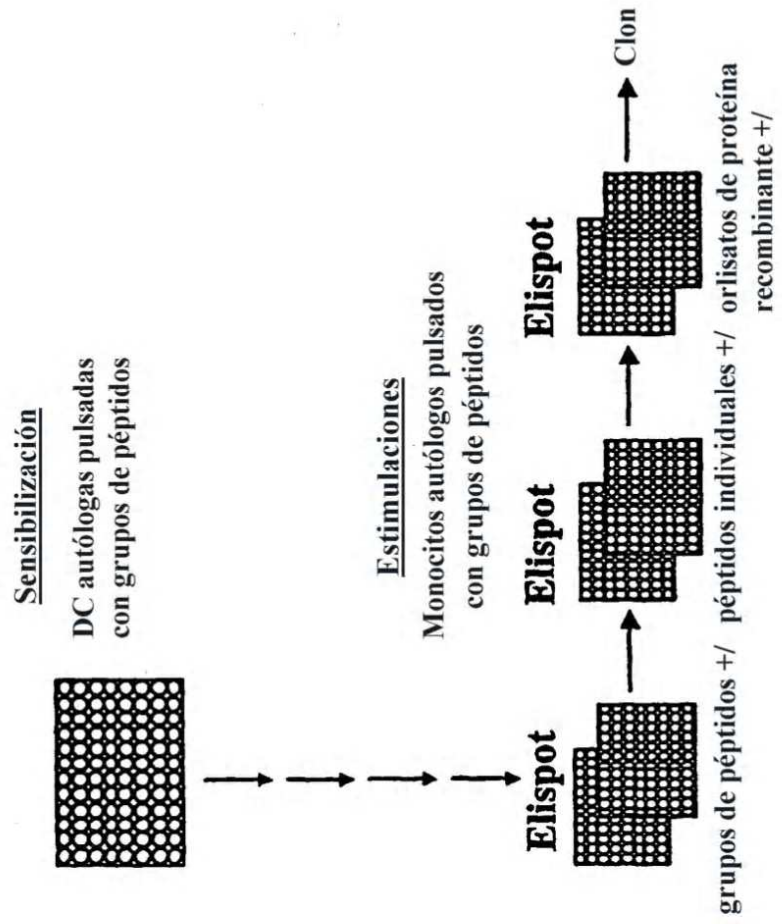
FIG. 1

# Protocolo General para Sensibilización de Linfocitos T CD8 de Gen Completo *in vitro*



**FIG. 2**

# Protocolo General para Sensibilización de Linfocitos T CD4 de Gen Completo *in vitro*



**FIG. 3**

**MICROPLACA DE LEUCEMIA/LINFOMA N° 3: SONDAS USADAS EN ANÁLISIS**

Sonda Cy3		Sonda Cy5	
Tejido	ARN N°	ARN N°	Tejido
Linfoma, linfocitos T	952	SPACT74	Riñón N
Linfoma, linfocitos B	955	SPACT81	Hígado N
Linfoma, linfocitos B	953	SPAGT78	Pulmón N
Linfoma	916	SPACT42	Cerebro N
Linfoma, Hodgkins	950	138598B	Piel N
Linfoma, Hodgkins	950	SPACT49	Médula ósea N
Linfoma linfocitos B	CL151	888	PBMC en reposo
Linfoma linfocitos T	904B	SPACT55	Estómago N
Linfoma, Hodgkins véase ARN 959	CL153	SPACT70	Timo N
Linfoma, linfocitos B	CL152	SPACT75	Músculo esquelético N
Linfoma, linfocitos B véase ARN 958	CL155	SPACT73	Corazón N
Linfoma, linfocitos B	944	243502B	Esófago N
Linfoma, linfocitos B	958	1006	Colon N
Linfoma, linfocitos B	954	SPACT65	Intestino delgado N
Linfoma	960	779B	Tráquea N
Linfoma, linfocitos T	957	S9327328	Vejiga N
Linfoma, linfocitos B	914B		
Linfoma, linfocitos B	913		
Linfoma linfocitos B	944B		
Linfoma, linfocitos B/fracaso	903		

**VERDE:** Sondas Tumorales en las que se desearía expresión génica.

**ROJO:** Sondas de tejido esencial normal en las que la expresión génica debe evitarse.

**NEGRO:** Sondas de tejido normal en las que la expresión génica es aceptable

**FIG.4**

Ab Terapéuticos Candidatos para Hematología

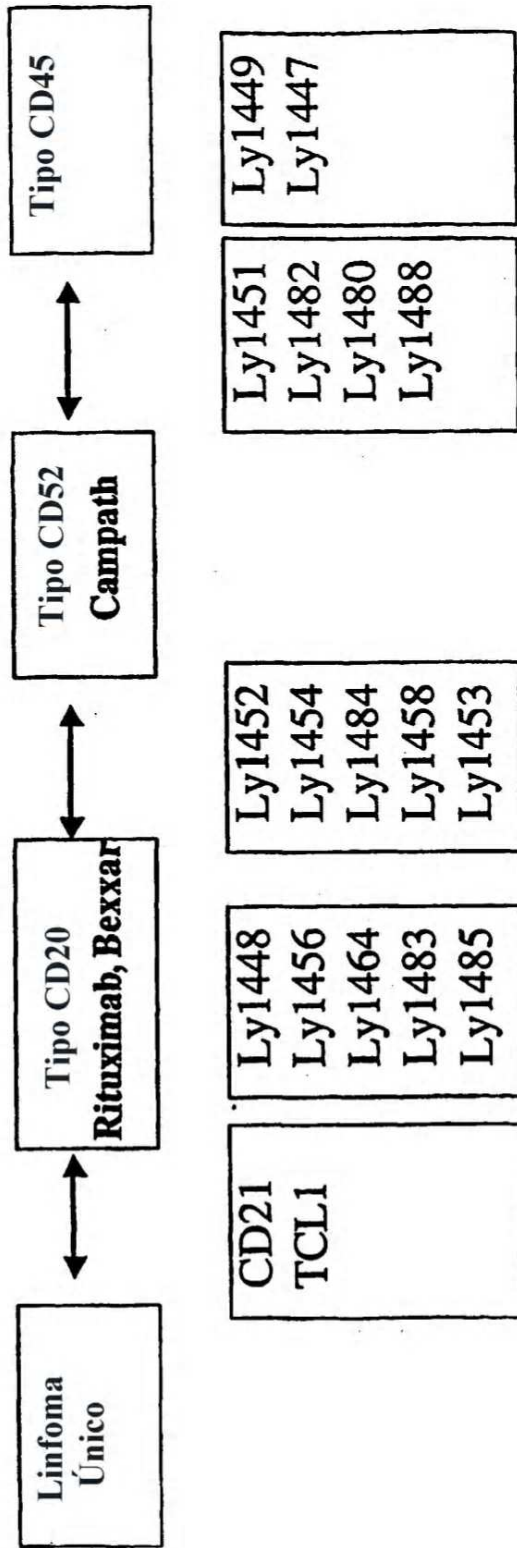


FIG. 5

**a. Informe de TMpred para Ly1484 Largo**

Fecha: 15/8/2001

RDFQSEVLLSAMELFHMTSGGDAAMFRDGKEPQPSAEAAAAPSLANISCF  
 TQKLVEKLYSGMFSADPRHILLFILEHIMVIEFASSQRDFVLSHLYSSL  
 NKVILHYGLSKPQOQSLSECLGLLSILGFLQEHWDVVFAT YNSNISFLLCLM  
 HCLLLLNERSYPEGFGLEPKPRMSTYHQVFLSPNEDVKEKREDLPSLSDV  
 QHNIQKTVQTLWQQLVAQRQQTLEDAFKIDLSVKPGEREVKIEEVTPLWE  
 ETMLKAWQHYLASEKKSLSASRSNVAHHSKVTLWSGSLSSAMKLMGRQAK  
 DPECKTEDFVSCIENYRRRGQELYASLYKDHVQRRKCGNIKAANAWARIQ  
 EQLFGELGLWSQGEETKPCSPWELDWREGPARMRKRIRKLSPLEALSSGR  
 HKESQDKNDHISQNAENQDELTLREAEGERPDEVGVDCTQLTFFPALHES  
 LHSEDFLELCRERQVILQELLDKEKVTQKFSLVIVQGHVSEGVLLLFCHQ  
 HIFYIGENFHLSPTEGDVYGERHCLSNISDPFFIQLNLCSKDRSTEDHYSQCHS  
 YADMRELROARFLLQDIALEIFFHNGYSKFLV FYNDRSKAFKSFCSFQP  
 SLK GKATSEDTLNLRRYPGSDRIMLQKWQRDISNFEYLMYLNNTAAGRTC  
 NDYMQYPVFPWVLADYTTSETLNLANPKIFRDLSKPMGAQTKERKLFQIR  
 FKEVEKTEGDMTVQCHYYTHYSSAIIVASYLVRMPPFTQAFCALQCCSFD  
 VADRMFHSVKSTWESASRENMSDVRELPPEFFYLPEFFLHENGNEVEFEQMQ  
 DETVLEDVQLPPWADCDPRKFTSLHRKALSDIFVSANLHHWIDLLEFYKQ  
 QCPAAVDVAVNLFHPMYFYCDRMDLSSTEDPLTKSHILGFVSNFEQVPKQLF  
 TKPHPARTAACKPIPKDVSHPVSLPCHPQPPFFYSLQSLRPSQVTVKDMY  
 LFSLSESESPKCAIGHIVSHEKPLAVERNKVLLPPLWNRHFSWGFDDFSC  
 GLESYESDKVLMHFFENLAAWERCLCAVCPSPFTIVHSCHSFVVGWELSM  
 TKGRPRELRLRQALVGHROAVICLAASVHFSLLVSGSQDCTGLWDLDEL  
 THVTRLPAHREGISAITLSDVSGPIVSCAGAHLSLWNVNCOPLASTIFAW  
 GPEGALTCCGLMECPAWDTSQILITCSQDCMVRWVKHEDVKMSVPERPAC  
 EEPLAOPPSPREHKWEKNLALSRELDVSTALTEKPSKTSPAVIALAVSRN  
 HFKLLVEDERERITFCWSADG (SEC ID N°: 10.847)

Negro = Intracelular, Rojo = Transmembrana,  
 Azul = Extracelular  
 Ly1484 Largo tiene 1269 aminoácidos y 5 dominios transmembrana

Dominio Transmembrana 1:	63-84	Puntuación: 1,36675
Dominio Transmembrana 2:	118-139	Puntuación: 1,38695
Dominio Transmembrana 3:	480-501	Puntuación: 1,36185
Dominio Transmembrana 4:	562-583	Puntuación: 1,31785
Dominio Transmembrana 5:	725-746	Puntuación: 1,3521

FIG. 6

**b. Informe de TMpred para Ly1484 (corto)**

Fecha: 20/8/2001

**MLQKWQKRDISNFEYLMYLNTAAGRTCNDYMQYPVFPWVLADYTSETLNL  
ANPKIFRDLSKPMGAQTKERKLFIQRFKEVEKTEGDMFTVQCHYYTHYS  
AIIVASYLVRMPPFTQAFCALQGESFDVADRMFHSVKSTWESASRENMSD  
VRELHPPEFFYLPEFFLNCNEVEFCMDETVLGDVQLPPWADGDPKQFIS  
LHRKALHESDFVSANTHHWIDLIFENYKQOQCPAAVDAVNILPHPYFYEDRMDL  
SSITDPLTKSHPILCFVSNFCQVFKQLFTKQHPARTFAACKPLPEKDVSHPV  
SLPCHPQPFYSLQSLRPSQVTVKDMVLFSLSESPKCATGHVSTKQFI  
LAVERNKVLLPPLWNRHFSWCFDDFSCCLCSYCSDKVLMHFFENLAAWERC  
LCAVCPSPHIVTSGRSHVVCWELSMKGRPRELRLRQALYCHFOAVIC  
LAASVHFSLLVSESDCCTCLWDLDLHLHIVTRLPAHRECHSATPISDVSE  
TIVSCACAHLSLWNVNGOPLASLTFWEPKALTCCLMECPAWDTESQIL  
IFESQDEMRVWKHEDVKMSVPERPACEEPLAOPPSPRGHKWEKNLALSR  
ELDVSTATLTKKPSKTSPTAVTALAVSRNHFKLLVEDERERITFCWSADG**

(SEC ID N°: 10.848)

**Negro = Intracelular, Rojo = Transmembrana,  
Azul = Extracelular**

**Ly1484 tiene 646 aminoácidos y 1 dominio transmembrana**

Dominio Transmembrana 1: 102-123

Puntuación: 1,3521

**FIG. 6 (cont.)**

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL PROGRAMA TSITES

\*\*\*\*\*

lun, 27 de ago, 2001 11:29:26 AM

Estos son los resultados del análisis del archivo → LY1484~1.TXT

Comenzando con el resto: 1 y terminando con el resto: 1270

Tamaño de ventana de AMPHI: 11

A-puntos medios de AMPHI de los bloques.

R-restos que coinciden con el motivo Rothbard/Taylor.

D-restos que coinciden con el motivo IAd.

d-restos que coinciden con el motivo IEd

(SEC ID N°: 10.847)

```

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
RDFQSEVLLSAMELFHMTSGDAAMFRDCKEPPSAEAAAAPSLANISCFITQKIVEKLYSGMFSADPRHILLFIL
.....AAAAA.....AAAA.AAA.....AAAAA.....RRRRRRRRRRR.....
.....RRRRR..RRRRRR.....DDDDDD.....
.....
80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150
EHIMVVIETASSQDITVLTLYSSLNKVIYCLSKPQQSLSECLGLLSILGFLQEHWDVVFATYNSNISFLLCLM
.....AAAAA.....AAAAA.....AAAAA.....RRRR..RRRR.....
.....RRRR...RRRR.....DDDDDD.....
.....DDDDDD.....
.....

```

FIG. 7





```

455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525
LHSEDFLELCRERQVILQELLKKEKVTQKFSLVIVQHLVSEGVLFGHQHFYICENFTLSPTGVDVYCTRHCLSN
...AAAAA...
...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...
...
530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600
ISDPFIFNLCSKDRSTDHYSCQCHSYADMRELQARFLLODIALEIFFHNGYSKFLVFNDRSKAFKSFCSFQP
A.AAAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...
...RRRRRRRRRRRR...RRRRRRRRRRRR...RRRRRRRRRRRR...RRRRRRRRRRRR...RRRRRRRRRRRR...
...
605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675
SLKGKATSEDTLNLRRYPGSDRIMLQKWQKRDISNFEYLMYLNATAAGRTCNDYMQYPVFPWVLADYTSETLNLAN
...AAAAA...AAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...
...RRRR.RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...
.DDDDD...
...
680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750
PKIFRDLSKPMGAQTKERKLFIQRFKEVEKTEGDMTVQCHYTHYSSAIIIVASYLVRMPPFTQAFCALQGGGFD
AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...A
.RRRR...RRRR...RRRR.RRRRR...RRRR.RRRRR...RRRR.RRRRR...RRRR.RRRRR...RRRR.R

```

FIG. 7 (cont.)



RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL PROGRAMA TSITES

\*\*\*\*\*

lun, 27 de ago, 2001 10:34:51 AM

Estos son los resultados del análisis del archivo → LY1484~2.TXT

Comenzando con el resto: 1 y terminando con el resto: 647

Tamaño de ventana de AMPHI: 11

FIG. 8

A-puntos medios de AMPHI de los bloques.

R-restos que coinciden con el motivo Rothbard/Taylor.

D-restos que coinciden con el motivo IAd.

d-restos que coinciden con el motivo IEd

(SEC ID N°:  
10.848)

```

5  10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75
MLQKWOKRDISNFEYLMYLNTAAGRTCNQYDQYVFPWVLADYTSFTLNLANPKIFRDLSPMGGAQTKERKLF
AAA.....AAAAAAA.....AAAAAAA.....AAAAAAA.....AAA
.....RRRR.....RRRR.....RRRR.....RRRR.....RRR
.....
80  85  90  95  100  105  110  115  120  125  130  135  140  145  150
QRFKEVEKTEGDMTVQCHYTHYSSAIIVASYLVRMPPFTQAFCALQGGSFVADRMFHSVKSTWESASRENMSD
AAAAAAA.....AAAA.....AAAAAAA.....AAAAAAA.....AA.AAAA..AA
R.....RRRR.RRRR.....RRRR.....RRRR.....RRRR.....
.....DDDDDDDDDD.....
155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225
VRELTPEFFYLPEFLTNCNGVEFGCMQDGTVLGDVQLPPWADGDPKFI SLHRKALESDFVSANLHHWIDLIFGY
AAA.....AAAA.....AAA.....RRRR.....RRRR.....RRRR.....RRRR.....
..RRRR.....RRRR.....RRRR.....RRRR.....RRRR.....
.....

```

```

230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300
KQOGPAAVDAVNIHFHYPFYGDRMDLSSITDPLIKSTILGFVSNFGQVPKQLFTKPHPARTAAGKPLPGKDVSTPV
...AAAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA
RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...
...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD
...

305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375
SLPGHPQPFYSLQSLRPSQVTVKDMYLFSLGSESPKGAIGHIVSTEKTI LAVERNKVLLPPLWNRTFSWGFDDF
AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA...AAAA
D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...D...
...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD
...

380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450
SCCLGSYGSVKVMTFENLAAWGRCLCAVCPSPPTIVTSGTSTVVCWELSMTKGRPRGLRLRQALYGHYQAVTC
...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA
RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...RRRR...
...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD...DDDDD
...

455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525
LAASVTFSLVSGSQDCTCILWDLDDLHVTHTVRLPAHREGISAITISDVSGTIVSCAGAHLSLWNVNGQPLASITTT
...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA...AAAAA
RRRRRR...RRRRRR...RRRRRR...RRRRRR...RRRRRR...RRRRRR...RRRRRR...RRRRRR...RRRRRR...RRRRRR
DDDDDDDDDD...DDDDDDDDDD...DDDDDDDDDD...DDDDDDDDDD...DDDDDDDDDD...DDDDDDDDDD...DDDDDDDDDD
...

```

FIG. 8 (cont.)

```

530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600
AWGPEGAITCCCLMEGPAWDTSQIIITGSQDGMVRVWKTEDVKMSVPGRPAGEEPLAQPPSPRGHKWEKNLALSR
.....
RRRR.....
D.....
.....
605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675
ELDVSIALTGKPSKTSPAVTALAVSRNHTKLLVGDERRGRIFCWSADG
.....
RRRR.....
DDDDDDDD.....
.....

```

FIG. 8 (cont.)