

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 214**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2008 E 12151047 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2457928**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal humano específico para cada tumor**

30 Prioridad:

**13.03.2007 EP 07005180**

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

**11.10.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)  
Prorektorat MNW Rämistrasse 71  
8006 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**ESSLINGER, CHRISTOPH;  
KUENZLE, SANDRA;  
ABELA, IRENE;  
ZIPPELIUS, ALFRED;  
JAEGER, DIRK;  
KNUTH, ALEXANDER;  
NITSCH, ROGER, M., D.;  
MOCH, HOLGER y  
GOEBELS, NORBERT**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 637 214 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal humano específico para cada tumor

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a moléculas de unión novedosas, específicas de cada tumor, particularmente anticuerpos humanos, así como fragmentos y sus variantes que reconocen, respectivamente, antígenos tumorales y antígenos asociados a tumores. Adicionalmente, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas de unión y anticuerpos en el tratamiento de diversos tumores, en particular melanoma, cáncer de mama y metástasis.

### Antecedentes de la invención

Las respuestas inmunes humores a tumores se producen con una frecuencia relativamente alta en (1, 2). Este fenómeno se aprovechó para identificar una variedad de antígenos asociados a tumores (taa) por medio de la criba de bibliotecas de expresión autóloga con suero de pacientes con cáncer (1). En la actualidad, varios de estos taa sirven como antígenos de células T para la inducción de respuestas de CTL anti-tumorales en pacientes (3, 4). Actualmente se está reconsiderando esta preferencia por la respuesta inmune celular, en la mayoría de los casos citotóxica, como estrategia terapéutica, y se diseñan vacunas novedosas para inducir también respuestas de anticuerpos. Se detectaron anticuerpos contra un antígeno asociado a tumores derivados de NY-ESO-1 en muestras biológicas de pacientes de cáncer de pulmón (documento US 05/0142620; Zeng et al., Int. J. Cancer: 114, 268-273 (2005)). En parte, en este cambio de concepto puede haber influido el reciente éxito de diversos anticuerpos monoclonales para terapia tumoral, tales como trastuzumab (Herceptin) y bevacizumab (Avastin) (5). Mientras que estos anticuerpos monoclonales se habían producido contra dianas con una supuesta relevancia oncológica, los anticuerpos que aparecen en pacientes con cáncer, ya sea espontáneamente o tras vacunación, forman una clase diferente de moléculas cuya significación terapéutica había resultado difícil de evaluar. Esto es debido en su mayor parte a la falta de planteamientos experimentales directos para su aislamiento y caracterización subsiguiente in vitro y en modelos animales de cáncer humano.

Así, existe una necesidad de superar las limitaciones antes descritas y de proporcionar un anticuerpo terapéutico y diagnóstico contra antígenos implicados en cáncer.

### Sumario de la invención

La presente invención hace uso de la respuesta inmune, específica de cada tumor, de pacientes con cáncer para el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos específicos de cada antígeno tumoral y de cada antígeno asociado a un tumor (taa). En particular, experimentos realizados de acuerdo con la presente invención resultaron satisfactorios en el aislamiento de un anticuerpo monoclonal específico del taa NY-ESO-1 de un paciente con melanoma que presentaba un título sérico para NY-ESO-1 y una respuesta clínica parcial. Para aislar el anticuerpo humano específico de un antígeno tumoral y de un taa, respectivamente, se usaron micromatrices de tejido (TMA) que utilizan inmunohistoquímica (IHC).

Por tanto, la presente invención va dirigida a anticuerpos humanos y a fragmentos de unión con antígenos de los mismos que tienen la capacidad de reconocer el antígeno NY-ESO-1 asociado a tumores. Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden dichos anticuerpos y a métodos inmunoterapéuticos e inmunodiagnósticos que los usan.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el anticuerpo humano o fragmento de unión con antígenos del mismo demuestra las características de unión inmunológicas de un anticuerpo caracterizado por las regiones variables  $V_H$  y/p  $V_L$  según se expone en la Figura 4 (ID SEC N°: 2 y 4). Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, xenogénico, o un anticuerpo quimérico humano-murino, resultando particularmente útil este último para métodos de diagnóstico y estudios en animales. También se incluyen composiciones terapéuticas que incluyen el anticuerpo o fragmentos activos del mismo, y métodos para usar dichas composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de un tumor usando estas composiciones, en las que se administra una cantidad eficaz de la composición a un paciente que necesita dicho tratamiento.

El fragmento de unión con antígenos del anticuerpo puede ser un fragmento  $F_v$  monocatenario, un fragmento  $F(ab)'$ , un fragmento  $F(ab)$ , y un fragmento  $F(ab)'$ <sub>2</sub>, o cualquier otro fragmento de unión con antígenos. En una realización específica, más adelante, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo isotipo IgG humano.

Naturalmente, la presente exposición se extiende al linfocito B humano, inmortalizado, con memoria y a la célula B, respectivamente, que produce el anticuerpo que tiene las características distintivas y únicas que se definen posteriormente.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican por lo menos una región variable de una

cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Preferentemente, dicha región variable comprende la al menos única región determinante de complementariedad (CDR) del V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la región variable según se expone en la Figura 4 (ID SEC N°: 5 a 10).

- 5 Por consiguiente, la presente invención abarca también vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células hospedantes transformadas con los mismos, así como su uso para la producción de un anticuerpo y moléculas de unión equivalentes que son específicas de antígenos que son indicativos y/o causantes de un tumor, en particular de melanoma o cáncer de mama.
- 10 El anticuerpo, la(s) cadena(s) de inmunoglobulina, los fragmentos de unión de los mismos y el antígeno de unión a dicho anticuerpo se pueden usar en composiciones farmacéuticas y de diagnóstico para la inmunoterapia y la diagnosis de tumores, respectivamente. No obstante, se prefiere el uso de las composiciones anteriores en la preparación de un medicamento.
- 15 Por lo tanto, un objetivo particular de la presente invención es proporcionar métodos para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa tal como un carcinoma de mama primario y metástasis. Los métodos comprenden administrar una concentración eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al mismo para el sujeto en el que el anticuerpo dirige a diana tejido y células tumorales.
- 20 A partir de la descripción y los ejemplos que vienen a continuación se pondrán de manifiesto otras realizaciones de la presente invención.

#### Breve descripción de los dibujos

- 25 Fig. 1: El pocillo de cultivo de células B de memoria 12 D7 contiene anticuerpos específicos del NY-ESO-1. se analizó medio condicionado por cultivos de células B de memoria se analizó con la presencia de anticuerpos humanos específicos del NY-ESO-1 A) en ELISA presentando NY-ESO-1 recombinante de longitud completa. B) En inmunohistoquímica sobre carcinoma de mama (mc) positivo para NY-ESO-1 y sobre tejido de testigo (ct) negativo para NY-ESO-1. Se muestra la tinción obtenida con medio condicionado de dos pocillos de cultivo de células B de memoria positivas para ELISA (9D1, 12D7). C) El anticuerpo específico de NY-ESO-1 contenido en el pocillo 12D7 es de la subclase IgG1 tal como se demuestra por la tinción de tejido positivo para NY-ESO-1 con medio condicionado de células B del pocillo de cultivo 12D7 seguido por anticuerpos secundarios contra las subclases IgG1-4 de IgG.
- 30
- 35 Fig. 2: El clon número 4 del anticuerpo humano recombinante 12D7 obtenido mediante RT-PCR de células individuales sobre células B de memoria cultivadas reconoce específicamente el NY-ESO-1 en ELISA y en secciones de tejido. El fluido sobrenadante (SN) recolectado a partir de células 293T HEK transfectadas con vectores de expresión de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera que expresan el clon 12D7 número cuatro se sometió a ensayo en relación con la especificidad con respecto al NY-ESO-1 en A) ELISA presentando NY-ESO-1 de longitud completa. Se indican valores ELISA para SN sin diluir (1:12D7.4 SN), una dilución 1/10 (2:12D7.4 SN) y una dilución 1/100 (3:12D7.4 SN). A efecto comparativos, también se muestra la señal de ELISA obtenida con plasma del paciente del cual se obtuvieron los cultivos de células B de memoria utilizados como una dilución 1/100 (4). Como testigos, se muestra la ausencia de unión a placas ELISA recubiertas con NY-ESO-1 de SN obtenido con la transfección de un anticuerpo recombinante irrelevante producido de la misma forma que 12D7.4 (5) así como la ausencia de unión del clon n.º 4 de 12D7 a placas ELISA recubiertas con un antígeno irrelevante. B) La inmunohistoquímica sobre carcinoma de mama (mc) positivo para NY-ESO-1 y sobre tejido de testigo (ct) negativo para NY-ESO-1 muestra la unión específica del clon n.º 4 de 12D7 recombinante a carcinoma de mama.
- 40
- 45
- 50 Fig. 3: Características del anticuerpo monoclonal humano Manhattan. Se realizó un mapeo de epítomos utilizando péptidos solapantes que abarcan la proteína NY-ESO-1 total que recubre placas ELISA. A) El Manhattan se une específicamente a un péptido que abarca los aminoácidos 11 a 30 en el extremo N de la proteína NYESO-1. B) El suero del paciente C1 reconoce diversos fragmentos peptídicos en el extremo N y la región central de NY-ESO-1. C) Experimentos ELISA de competición con el péptido NY-ESO-111-30 determinan la aidez del Manhattan como KD = 10<sup>-10</sup>. D) La tinción por inmunofluorescencia de la línea celular SK-MEL-37 positiva para NY-ESO-1 con humAb (anticuerpo humano) Manhattan muestra la co-localización de la tinción de NY-ESO-1 con el marcador nuclear Hoechst. El 8-15c5 humano recombinante del anticuerpo testigo, específico del MOG no se une.
- 55
- 60 Fig. 4: Secuencias amino y nucleótidas de la región variable, es decir cadena pesada y cadena ligera kappa del anticuerpo 12D7. Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) están subrayadas.

#### Descripción detallada de la invención

- La presente exposición se refiere en general a anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión con antígenos, que demuestran las características de unión inmunológicas y/o propiedades biológicas que se expresan en líneas generales para el anticuerpo ilustrado en los Ejemplos. Cuando aparece, la expresión "características de unión inmunológicas", u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, en todas sus formas
- 65

gramaticales, se refiere a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada, y otras características de unión de un anticuerpo. Naturalmente, la presente invención se extiende también a líneas celulares y células recombinantes que producen el anticuerpo. La presente invención se refiere además a ensayos de diagnóstico y a estuches de ensayo que comprenden la molécula de unión de la presente invención y a métodos terapéuticos basados en los mismos.

5 De acuerdo con la presente invención, se clonó un anticuerpo humano específico del antígeno NY-ESO-1 asociado a tumor proveniente de un paciente con melanoma que resultó seropositivo para NY-ESO-1 en ELISA y sobre secciones autólogas tumorales usando un método para identificar, validar y producir moléculas de unión útiles diagnóstica y terapéuticamente en tumores. La criba de candidatos para anticuerpos se realizó sobre ensayos ELISA  
10 y sobre tejido tumoral utilizando una adaptación de la tecnología de micromatrices de tejido. Se mostró que el anticuerpo monoclonal humano obtenido reactivo al tejido se une al extremo N de NY-ESO-1 que es también compartido por el antígeno asociado a tumor LAGE-1; véase el Ejemplo 3.

15 Salvo que se indique lo contrario, los términos "cáncer" y "tumor" se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria descriptiva.

Por motivos de claridad únicamente y sin limitar el alcance de la presente invención, la mayoría de las siguientes realizaciones se describen con respecto a anticuerpos humanos que representan las moléculas de unión preferidas para el desarrollo de agentes terapéuticos y diagnósticos de acuerdo con la presente invención.

20 El NY-ESO-1 se ha identificado originalmente en un paciente con cáncer de esófago utilizando una técnica de clonación basada en anticuerpos (SEREX, véase más adelante). Recientemente se podía mostrar que el NY-ESO-1 puede representar el antígeno CT más inmunogénico, debido a que se pueden observar respuestas inmunes celulares y humorales espontáneas en un alto porcentaje de pacientes con tumores que expresan el NY-ESO-1  
25 (Gnjatic et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA 100 (2003), 8862-8867; Jager y Knuth, Breast 14 (2005), 631-635).

Debido a que los antígenos CT se expresan selectivamente en células tumorales humanas y en espermatogonias de los testículos, los mismos representan un grupo prometedor de antígenos diana para un planteamiento inmunoterapéutico en pacientes con cáncer. Entre los mismos, el NY-ESO-1 parece ser fuertemente inmunogénico y  
30 se sabe que induce una respuesta inmune humoral y celular eficiente en pacientes con melanoma y cáncer de ovario, de mama, de pulmón, así como también de vejiga, haciendo que resulte una diana ideal para inmunoterapia de cáncer activo. Para información sobre las secuencias nucleóticas y de aminoácidos así como origen, bibliografía básica, etcétera, de antígenos tumorales y antígenos asociados a tumores, véanse bases de datos apropiadas tales como UniProtKB/Swiss-Prot alojada por el EMBL, en la cual se puede encontrar una entrada para NY-ESO-1 con el  
35 número de acceso primario P78358.

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de la presente invención se une a un epítipo definido por una secuencia de aminoácidos establecida en la ID SEC N°: 11 que representa los residuos de aminoácidos 11 a 30 de la proteína NY-ESO-1.

40 Se conocen en la técnica medios y métodos para la producción recombinante de anticuerpos y miméticos de los mismos, así como métodos de cribado para moléculas de unión competidoras, que pueden ser o no anticuerpos; véanse también los Ejemplos. No obstante, tal como se describe en la presente, en particular con respecto a aplicaciones terapéuticas en humanos, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano en el sentido  
45 de que la aplicación de dicho anticuerpo está sustancialmente libre de una respuesta del anticuerpo anti-murino humano (HAMA) observada, por otro lado, para anticuerpos quiméricos e incluso humanizados.

Por otra parte, tal como se demuestra en el Ejemplo 3 adjunto, se ha identificado y clonado un anticuerpo que presenta una afinidad de unión particularmente alta con una constante de disociación (KD) en equilibrio de la interacción con su antígeno cognado situada en la parte inferior de los valores nanomolares. Preferentemente, la afinidad de unión de la molécula de unión de la presente invención con su antígeno cognado es de aproximadamente por lo menos  $10^{-7}$  M, más preferentemente por lo menos  $10^{-8}$  M, de forma particularmente preferente  $10^{-9}$  M y todavía más preferentemente por lo menos  $10^{-10}$  M.

55 La presente invención ilustra un anticuerpo anti-NY-ESO-1 humano y fragmentos de unión del mismo, que se puede caracterizar por comprender en su región variable, es decir, el dominio de unión al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la  $V_H$  y/p  $V_L$  de la región variable que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 4 de (VH) (ID SEC N°: 2) y (VL) (ID SEC N°: 4). Un conjunto ilustrativo de CDRs de las anteriores secuencias de aminoácidos de la región de VH y VL según se representa en la Figura 4 se proporciona en las ID SEC N°: 5 a 10. Sin embargo, como se expone en lo que sigue, el experto en la técnica es conocedor de que de forma adicional alternativa pueden ser usados CDRs que difieren en su secuencia de aminoácidos respecto a los expuesto en las SEC ID N° 5 a 10 en uno, dos, tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3.

65 En una realización, el anticuerpo de la presente invención es uno cualquiera de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región VH y VL como se representa en la Figura 4. Esos anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados, xenogénicos o humanos-murinos quiméricos, en particular, para aplicaciones

terapéuticas. Un fragmento de unión con antígenos del anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fv monocatenario (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab), o un fragmento F(ab')<sub>2</sub>.

5 De esta forma, para algunas aplicaciones sólo se requieren las regiones variables de los anticuerpos, las cuales se pueden obtener tratando el anticuerpo con reactivos adecuados con el fin de generar las fracciones Fab', Fab, o F(ab')<sub>2</sub>. Dichos fragmentos son suficientes para ser usados, por ejemplo, en procedimientos inmunodiagnósticos que implican el acoplamiento de las fracciones inmunoespecíficas de inmunoglobulinas a reactivos de detección tales como radioisótopos.

10 Como alternativa a la obtención de inmunoglobulinas directamente a partir del cultivo de células B inmortalizadas o células B de memoria, las células inmortalizadas se pueden utilizar como fuente de loci de cadena pesada y cadena ligera reorganizados para la expresión y/o manipulación genética posteriores. Los genes reorganizados del anticuerpo se pueden retrotranscribir a partir de ARNm adecuados para producir ADNc. Si se desea, la región constante de cadena pesada se puede intercambiar por la de un isotipo diferente o se puede eliminar en su totalidad. Las regiones variables se pueden enlazar para codificar regiones Fv monocatenarias. Se pueden enlazar  
15 múltiples regiones Fv para conferir capacidad de unión a más de una diana o se pueden utilizar combinaciones químicas de cadena pesada y ligera. Una vez que el material genético está disponible, el diseño de análogos, según se ha descrito anteriormente, que mantienen su capacidad de unión a la diana deseada. Los métodos para la clonación de regiones variables del anticuerpo y la generación de anticuerpos recombinantes son conocidos por los  
20 expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la publicación de Gilliland et al., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

Una vez que se obtiene el material genético adecuado y, si se desea, el mismo se modifica para codificar análogo, las secuencias de codificación, incluyendo aquellas que codifican, a un mínimo, las regiones variables de la cadena  
25 pesada y ligera, se pueden insertar en sistemas de expresión contenidos en vectores que se pueden transfectar en células hospedantes recombinantes convencionales. Se puede utilizar una variedad de estas células hospedantes; no obstante, para un procesado eficaz, se prefieren células de mamífero. Las líneas celulares de mamífero típicas útiles para este fin incluyen células CHO, células HEK 293, o células NSO. A continuación, se procede a la producción del anticuerpo o análogo cultivando el hospedante recombinante modificado bajo condiciones adecuadas de cultivo para el crecimiento de las células hospedantes y la expresión de las secuencias de codificación. Los  
30 anticuerpos se recuperan a continuación aislándolos del cultivo. Los sistemas de expresión se diseñan preferentemente para que incluyan péptidos señal de manera que los anticuerpos resultantes se secreten en el medio; no obstante, también es posible una producción intracelular.

35 En otra realización, la presente exposición se refiere a un antígeno NY-ESO-1 que es reconocido por el anticuerpo de la presente invención, descrito con anterioridad, tanto en la forma péptida como en la forma modificada postraducciona, en que el antígeno es preferentemente un péptido que consiste en al menos 6-50 y, preferentemente, no más de 10-100 aminoácidos de longitud, que contiene el epitopo afín. Lo más preferentemente, el antígeno de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos de ID SEC N°: 11 y consiste en  
40 aproximadamente 10 a 30 aminoácidos y, preferentemente, tiene no más de aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. La molécula es suficientemente grande para ser antigénica sin ninguna modificación postraducciona, y por lo tanto es útil como inmunógeno, cuando se combina con un adyuvante (o sin el mismo), en formas tanto de precursor como modificadas postraduccionalmente. Estos antígenos y péptidos se puede utilizar para determinar si en una muestra, tal como suero o sangre, hay presentes o no anticuerpos. Preferentemente, el antígeno de la  
45 presente exposición es capaz de provocar una respuesta humoral en un ser humano.

De acuerdo con lo anterior, la presente exposición también se refiere a un polinucleótido que codifica el antígeno o fragmento de unión del mismo de la presente invención, en el caso del anticuerpo preferentemente por lo menos una  
50 región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. Normalmente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende al menos una región determinante de complementariedad al menos (CDR) de la V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> de la región variable de dicho anticuerpo. Los expertos en la técnica saben que cada dominio variable (la cadena pesada V<sub>H</sub> y la cadena ligera V<sub>L</sub>) de un anticuerpo comprende tres regiones hipervariables, en ocasiones denominadas regiones determinantes de complementariedad o "CDRs" flanqueadas por cuatro regiones de armazón o "FRs" relativamente conservadas y se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión con antígenos. Las regiones hipervariables o las CDRs del subtipo IgG humano de anticuerpo comprenden residuos de aminoácidos provenientes de los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada como se describe por Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup>. Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991) y/o aquellos residuos provenientes de un bucle hipervariable, es decir los residuos 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 según describen Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901- 917. Los residuos de armazón o FR son aquellos residuos de dominio variable que no son las regiones hipervariables y que están delimitados por estas últimas. El término "unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una constante de disociación (KD) de 10<sup>-7</sup> M o menor, y se une al antígeno predeterminado con una KD que es por lo menos dos veces menor que su KD para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína, o cualquier otro  
65

polipéptido especificado) distinto del antígeno predeterminado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico de un antígeno" se utilizan de manera intercambiable en la presente con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno". Tal como se usa en la presente, unión "altamente específica" significa que la KD relativa del anticuerpo para el epítipo diana específico, es decir taa NY-ESO-1, es por lo menos 10 veces menor que la KD para unir ese anticuerpo a otros ligandos. Preferentemente, el anticuerpo se une a su antígeno NY-ESO-1 cognado con una constante de disociación (KD) de  $10^{-9}$  M o menor.

La afinidad o avidéz de un anticuerpo por un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier método adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen interactions" en *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis, *Immunology*, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), y métodos descritos en la presente. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide bajo condiciones diferentes, por ejemplo, concentración salina, pH. De esta forma, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión con antígenos, por ejemplo, K sub D, IC50, preferentemente se realizan con soluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón normalizado.

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrito anteriormente se puede utilizar para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad y función biológica deseadas. De esta forma, la presente exposición también abarca polipéptidos y anticuerpos que comprenden las CDR al menos única del dominio variable descrito anteriormente y que ventajosamente tienen sustancialmente propiedades de unión iguales o similares a las del anticuerpo descrito en los ejemplos adjuntos. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que con la utilización de los dominios variables o CDRs descritos en la presente se pueden construir anticuerpos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describe en las solicitudes de patente europea EP 0 451 216 A1 y EP 0 549 581 A1. Además, los expertos en la técnica saben que la afinidad de unión se puede mejorar realizando sustituciones de aminoácidos dentro de las CDRs o dentro de los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917) que se solapan parcialmente con las CDRs según define Kabat. Por tanto, la presente invención se refiere también a anticuerpos en los que una o más de las CDRs mencionadas comprenden uno o más, preferentemente no más de dos sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, el anticuerpo de la invención comprende en una o más de sus cadenas de inmunoglobulina dos o la totalidad las tres CDRs de las regiones variables según se establece en las ID SEC N<sup>o</sup>: 5 a 10.

El polinucleótido de la invención que codifica el anticuerpo descrito anteriormente puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN o ADN o ARN producido sintéticamente o una molécula quimérica de ácido nucleico producida de manera recombinante que comprende cualquiera de dichos polinucleótidos o bien de manera individual o bien combinados. Preferentemente dicho polinucleótido es parte de un vector. Dichos vectores pueden comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permitan la selección de dicho vector en una célula hospedante adecuada y bajo condiciones adecuadas.

Preferentemente, el polinucleótido de la invención se enlaza funcionalmente con secuencias de control de expresión que permiten la expresión en células procariotas o eucariotas. La expresión de dicho polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un ARNm traducible. Son bien conocidos por los expertos en la técnica, elementos reguladores que garantizan la expresión en células eucariotas, preferentemente células de mamífero. Los mismos comprenden habitualmente secuencias reguladoras que garantizan el inicio de la transcripción y opcionalmente señales de poli-A que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales, y/o regiones promotoras asociadas de forma natural o heterólogas.

En relación con esto, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los polinucleótidos de la exposición que codifican por lo menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar los dominios variables de ambas cadenas de inmunoglobulina o sólo una. Asimismo, dichos polinucleótidos pueden estar bajo el control del mismo promotor o se pueden controlar por separado para la expresión. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedantes procariotas comprenden, por ejemplo, el promotor PL, lac, trp o tac en *E. coli*, y los ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedantes eucariotas son el promotor AOX1 ó GAL1 en levadura o el promotor CMV, SV40, RSV, el potenciador CMV, el potenciador SV40 ó un intrón de globina en células de mamíferos y de otros animales.

Además de elementos que son responsables del inicio de la transcripción, estos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, aguas abajo del polinucleótido. Además, en función del sistema de expresión utilizado, a la secuencia codificante del polinucleótido de la invención se le pueden añadir secuencias líderes capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo en el medio y las mismas son bien conocidas en la técnica. La(s) secuencia(s) líder(es) se ensambla(n) en fase adecuada con secuencias de traducción, inicio y terminación, y preferentemente, una secuencia líder con capacidad de dirigir la secreción de proteína traducida, o una porción de la misma, en el espacio periplásmico o medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación de extremo C o N que comunica características deseadas, por

ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. En este contexto, se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados tales como el vector de expresión pcDV1 de ADNc Okayama-Berg (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcADN1, pcADN3 (Invitrogen), o pSPORT1 (GIBCO BRL).

5 Preferentemente, las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedantes eucariotas, aunque también se pueden utilizar secuencias de control para hospedantes procariontes. Una vez que el vector se ha incorporado al hospedante adecuado, el  
 10 hospedante se mantiene bajo condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias nucleótidas, y, según se desee, puede venir a continuación la recolección y purificación de las cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina; véase, Beychok, Cells of Immunoglobulin, Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979).

Además, la presente exposición se refiere a vectores, en particular plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos  
 15 utilizados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden un polinucleótido que codifica el antígeno o, preferentemente, un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo de la invención; opcionalmente en combinación con un polinucleótido de la invención que codifica el dominio variable de la otra cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Preferentemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia génica o de inserción dirigida a diana de genes (gene targeting). Se pueden utilizar  
 20 vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adeno-asociado, virus herpes, o virus del papiloma bovino, para el suministro de los polinucleótidos o vector de la invención en la población celular diana. Se pueden utilizar métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores virales recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green  
 25 Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternativamente, los polinucleótidos y vectores de la invención se pueden reconstituir en liposomas para el suministro a células diana. Los vectores que contienen los polinucleótidos de la invención (por ejemplo, el(los) dominio(s) variable(s) pesados y/o ligeros de las cadenas de inmunoglobulina que codifican secuencias y secuencias de control de expresión) se pueden transferir a la célula hospedante mediante métodos bien conocidos, que varían en función del tipo de hospedante celular. Por ejemplo,  
 30 para células procariontes se utiliza comúnmente la transfección con cloruro de calcio, mientras que para otros 5 hospedantes celulares se puede utilizar tratamiento con fosfato de calcio o electroporación; véase Sambrook, más arriba.

La presente invención se refiere además a células hospedantes transformadas con un polinucleótido o vector de la  
 35 invención. Dicha célula hospedante puede ser una célula procarionte o eucariota. El polinucleótido o vector de la invención que está presente en la célula hospedante o bien se puede integrar en el genoma de la célula hospedante o bien se puede mantener extracromosómicamente. La célula hospedante puede ser cualquier célula procarionte o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, vegetal, animal o humana. Las células fúngicas preferidas son, por ejemplo, aquellas del género Saccharomyces, en particular las correspondientes de la especie S. cerevisiae. El término "procarionte" está destinado a incluir todas las bacterias que se puedan transformar o  
 40 transfectar con un ADN o moléculas de ARN para la expresión de un anticuerpo de la invención o las cadenas correspondientes de inmunoglobulina. Los hospedantes procariontes pueden incluir bacterias gram-negativas así como gram-positivas tales como, por ejemplo, E. coli, S. typhimurium, Serratia marcescens y Bacillus subtilis. El término "eucariota" está destinado a incluir células de levadura, de vegetales superiores, de insectos y preferentemente de mamífero, con la mayor preferencia células HEK 293, NSO y CHO. En función del hospedante utilizado en un procedimiento de producción recombinante, los anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina codificados por el polinucleótido de la presente invención se pueden glicosilar o pueden ser no glicosilados. Los anticuerpos de la invención o las cadenas correspondientes de inmunoglobulina también pueden incluir un residuo de aminoácido metionina inicial. Un polinucleótido de la invención se puede utilizar para transformar o transfectar el  
 50 hospedante usando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por aquellos con conocimientos habituales en la materia. Además, son bien conocidos en la técnica métodos para preparar genes enlazados funcionalmente, fusionados, y expresarlos en, por ejemplo, células de mamífero y bacterias (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Los constructos y métodos genéticos descritos en la presente se pueden utilizar para la expresión del anticuerpo de la invención o las cadenas correspondientes de inmunoglobulina en hospedantes eucariotas o procariontes. En general, conjuntamente con el hospedante se utilizan vectores de expresión que contienen secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficiente del polinucleótido insertado. El vector de expresión contiene normalmente un origen de replicación, un promotor, y un terminador, así como genes específicos que son capaces de proporcionar una selección fenotípica de las células transformadas. Las células fuente adecuadas para las secuencias de ADN y las células hospedantes para la expresión y secreción de inmunoglobulina se pueden obtener a partir de varias fuentes, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas," Quinta Edición (1985) Rockville, Maryland, U.S.A., que se incorpora como referencia a la presente memoria descriptiva). Además, para la producción a gran escala del anticuerpo de la invención se pueden utilizar animales transgénicos, preferentemente mamíferos,  
 60 que comprenden células de la invención.

65 De esta forma, en una realización adicional, la presente invención se refiere a un método para la producción de un

anticuerpo o un fragmento de unión de los mismos, comprendiendo dicho método:

(a) cultivar una célula según se ha descrito anteriormente; y

5 (b) aislar del cultivo dicho anticuerpo o fragmento de unión de los mismos.

Los hospedantes transformados se pueden desarrollar en fermentadores y cultivar de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica para alcanzar un crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente  
10 invención, se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares; véase, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). El anticuerpo o su(s) cadena(s) correspondiente(s) de inmunoglobulina de la invención se pueden aislar a continuación con respecto al medio de crecimiento, lisados celulares, o fracciones de la membrana celular. El aislamiento y purificación, por ejemplo, de los anticuerpos expresados de forma recombinante o las cadenas de inmunoglobulina de la invención pueden ser a través de  
15 cualesquiera medios convencionales tales como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como aquellas que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, por ejemplo, contra la región constante del anticuerpo de la invención. Se pondrá de manifiesto para los expertos en la técnica que los anticuerpos de la invención se pueden acoplar además a otras fracciones, por ejemplo, para aplicaciones dirigidas a fármacos y formación de imágenes. Este acoplamiento se puede llevar a cabo químicamente después de la expresión del anticuerpo o antígeno al sitio de fijación, o el producto de acoplamiento se puede modificar por ingeniería genética en el anticuerpo o antígeno de la invención al nivel del ADN. Los ADNs se expresan a continuación en un sistema hospedante adecuado, y las proteínas expresadas se extraen y se renaturalizan, si es necesario.

25 Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras con una homogeneidad de por lo menos aproximadamente entre el 90 y el 95%, y con la mayor preferencia una homogeneidad de entre el 98 y el 99% o mayor, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, los anticuerpos se pueden utilizar a continuación terapéuticamente (incluyendo extracorporalmente) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo.

30 La presente exposición también implica un método para producir células capaces de expresar un anticuerpo de la invención o su(s) cadena(s) correspondiente(s) de inmunoglobulina, que comprende modificar por ingeniería genética células con el polinucleótido o con el vector de la invención. Las células obtenibles mediante el método de la exposición se pueden utilizar, por ejemplo, para someter a prueba la interacción del anticuerpo de la invención con su antígeno.

40 Como se ha mencionado anteriormente, la inmunoglobulina o sus ADNs de codificación se pueden modificar adicionalmente. De esta forma, en una realización adicional el método de la presente exposición comprende una cualquiera de la(s) etapa(s) para producir un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, un anticuerpo bi-específico, un anticuerpo de fusión, un anticuerpo marcado o un análogo de uno cualquiera de los mencionados. Los métodos correspondientes son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Cuando se obtienen derivados de dichos anticuerpos mediante la técnica de presentación en fagos,  
45 se puede utilizar resonancia de plasmón superficie tal como se usa en el sistema BIAcore para aumentar la eficacia de los anticuerpos de fagos que se unen al mismo epítipo que el correspondiente de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO89/09622. Los métodos para la producción de anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, la solicitud europea EP-A1 0 239 400 y la solicitud internacional WO90/07861. Fuentes adicionales de anticuerpos a usar de acuerdo con la presente invención son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos como anticuerpos humanos en ratones se describe, por ejemplo, en las solicitudes internacionales WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO 96/33735. Como se descrito anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una variedad de formas además de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como en cadenas individuales; véase por  
55 ejemplo, la solicitud internacional WO88/09344.

60 Los anticuerpos de la presente invención o su(s) cadena(s) correspondiente(s) de inmunoglobulina se pueden modificar adicionalmente utilizando técnicas convencionales conocidas en la materia, por ejemplo, usando supresión(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es), y/o recombinación(es) de aminoácidos y/o cualquiera otra(s) modificación(es) conocida(s) en la técnica o bien de manera individual o bien combinadas. Los métodos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN que subyace bajo la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos para los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in  
65 Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos

constituyentes, incluyendo modificaciones de cadena lateral, modificaciones del esqueleto estructural, y modificaciones N y C-terminales incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación, y la fijación de fracciones de carbohidrato o lipídicas, cofactores, y similares. Asimismo, la presente invención abarca la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino fusionado a la molécula heteróloga, tal como un ligando inmunoestimulante en el extremo carboxilo; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO00/30680 para obtener detalles técnicos correspondientes.

Adicionalmente, la presente invención abarca péptidos pequeños que incluyen los que contienen una molécula de unión como se describió anteriormente, por ejemplo, que contienen la región CD43 de la región variable de uno cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados, en particular CDR3 de la cadena pesada, ya que se ha observado frecuentemente que la cadena pesada CDR3 (HCDR3) es la región que tiene un mayor grado de variabilidad y una participación predominante en la interacción antígeno-anticuerpo. Estos péptidos pueden ser fácilmente sintetizados o producidos por medios recombinantes para producir un agente de unión útil según la invención. Los métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los péptidos pueden ser sintetizados, por ejemplo, usando sintetizadores de péptidos automatizados que están disponibles en el comercio. Los péptidos pueden ser producidos mediante técnicas recombinantes incorporando el DNA que expresa el péptido en un vector de expresión y transformando células con el vector de expresión para producir el péptido.

Por lo tanto, la presente exposición se refiere a cualquier molécula de unión, anticuerpo o fragmento de unión que se pueden obtener de acuerdo con medios descritos anteriormente y presentan las propiedades mencionadas, es decir, que reconocen específicamente el NY-ESO-1, y que, para uso terapéutico, mantienen preferentemente un armazón sustancialmente humano para quedar desprovistos de inmunogenicidad en un paciente.

En una realización adicional de la presente exposición, se marca de manera detectable el anticuerpo, la cadena de inmunoglobulina o un fragmento de unión de los mismos o el antígeno. Los agentes marcadores se pueden acoplar o bien directa o bien indirectamente a los anticuerpos o antígenos de la invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto es mediante el uso de una fracción espaciadora. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden comprender un dominio adicional, estando enlazado dicho dominio mediante enlaces covalentes o no covalentes. El enlace se puede basar en fusión genética de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica y descritos anteriormente o se puede realizar mediante, por ejemplo, reticulación química según se describe en, por ejemplo, la solicitud internacional WO94/04686. El dominio adicional presente en la proteína de fusión que comprende el anticuerpo de la invención preferentemente se puede enlazar mediante un enlazador flexible, ventajosamente un enlazador polipeptídico, en donde dicho enlazador polipeptídico comprende diversos aminoácidos, hidrófilos, unidos a péptidos, de una longitud suficiente para abarcar la distancia entre el extremo terminal C de dicho dominio adicional y el extremo terminal N del anticuerpo de la invención o viceversa. El agente terapéutica o diagnósticamente activo se puede acoplar al anticuerpo de la invención o a un fragmento del mismo de unión a antígenos por diversos medios. Esto incluye, por ejemplo, proteínas de fusión monocatenarias que comprenden las regiones variables del anticuerpo de la invención acopladas por métodos covalentes, tales como enlaces peptídicos, al agente terapéutica o diagnósticamente activo. Los ejemplos adicionales incluyen moléculas que comprenden por lo menos un fragmento de unión a antígenos acoplado a moléculas adicionales de manera covalente o no covalente incluyendo las correspondientes de la siguiente lista ilustrativa no limitativa. Trauneker, *Int. J. Cancer Surp. SuDP 7* (1992), 51-52, describen el reactivo biespecífico janusin en el cual la región Fv dirigida a CD3 se acopla a CD4 soluble o a otros ligandos tales como OVCA e IL-7. De modo similar, las regiones variables del anticuerpo de la invención se pueden construir en moléculas Fv y se acoplan a ligandos alternativos tales como aquellos ilustrados en el artículo citado. Higgins, *J. Infect Disease* 166 (1992), 198-202, describió un anticuerpo hetero-conjugado compuesto por OKT3 reticulado con un anticuerpo dirigido a una secuencia específica en la región V3 de GP120. Dichos anticuerpos hetero-conjugados también se pueden construir utilizando por lo menos las regiones variables contenidas en el anticuerpo de los métodos de la invención. Ejemplos adicionales de anticuerpos específicos incluyen aquellos descritos por Fanger, *Cancer Treat. Res.* 68 (1993), 181-194 y por Fanger, *Crit. Rev. Immunol.* 12 (1992), 101-124. Se han descrito ampliamente en la técnica conjugados que son inmunotoxinas que incluyen anticuerpos convencionales. Las toxinas se pueden acoplar a los anticuerpos mediante técnicas convencionales de acoplamiento, o se pueden producir inmunotoxinas que contienen porciones de toxina proteínica como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar de una forma correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Son ilustrativas de las inmunotoxinas mencionadas aquellas descritas por Byers, *Seminars Cell. Biol.* 2 (1991), 59-70 y por Fanger, *Immunol. Today* 12 (1991), 51-54.

La proteína de fusión descrita anteriormente puede comprender además un enlazador escindible o sitio de escisión para proteinasas. Estas fracciones espaciadoras, a su vez, pueden ser o bien insolubles o bien solubles (Diener et al., *Science* 231 (1986), 148) y se pueden seleccionar para permitir la liberación de fármacos desde el antígeno al sitio diana. Ejemplos de agentes terapéuticos y antígenos que se pueden acoplar a los anticuerpos de la presente invención para inmunoterapia son fármacos, radioisótopos, lectinas, y toxinas. Los fármacos con los cuales se pueden conjugar a los anticuerpos de la invención y antígenos de la presente exposición incluyen compuestos a los que se hace referencia clásicamente como fármacos tales como mitomicina C, daunorrubicina, y vinblastina. En el uso de anticuerpos conjugados radioisotópicamente de la invención o antígenos de la exposición para, por ejemplo, inmunoterapia tumoral, ciertos isótopos pueden ser más preferibles que otros en función de factores tales como la distribución de leucocitos, así como la estabilidad y la emisión. En función de la respuesta autoinmune, algunos

emisores pueden ser preferibles con respecto a otros. En general, en inmunoterapia se prefieren radioisótopos emisores de partículas  $\beta$  y  $\alpha$ . Se prefieren emisores  $\beta$  de corto alcance y alta energía tales como  $^{212}\text{Bi}$ . Ejemplos de radioisótopos que se pueden unir a los anticuerpos de la invención o antígenos de la exposición con fines terapéuticos son  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{At}$ ,  $^{211}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$  y  $^{188}\text{Re}$ . Se conocen otros agentes terapéuticos que se pueden acoplar al anticuerpo de la invención o antígeno de la exposición, así como protocolos terapéuticos ex vivo e *in vivo*, o los mismos pueden ser determinados fácilmente por aquellos con conocimientos habituales en la técnica. Cuando resulte apropiado, los expertos en la técnica pueden utilizar un polinucleótido de la exposición que codifica uno cualquiera de los anticuerpos o antígenos descritos anteriormente o los vectores correspondientes en lugar del propio material proteico.

Por lo tanto, la actividad biológica del anticuerpo y el dominio de unión identificados en la presente sugiere que tienen suficiente afinidad para que los mismos resulten candidatos potenciales para la localización de fármacos para células que expresan las estructuras superficiales adecuadas de la célula y tejido enfermos, respectivamente. Este apuntamiento y unión a células podrían ser útiles para el suministro de agentes terapéutica o diagnósticamente activa y terapia génica/administración de genes. Las moléculas/partículas con un anticuerpo de la invención se unirían específicamente a células/tejidos que expresan el antígeno NY-ESO-1, y por lo tanto podrían tener uso diagnóstico y terapéutico. De esta forma, el anticuerpo o antígeno de la presente exposición se puede marcar (por ejemplo, fluorescente, radiactivo, enzima, magnético nuclear, metal pesado) y se puede usar para detectar dianas específicas *in vivo* o *in vitro* incluyendo ensayos *in vitro* de tipo "inmunoquímica". *In vivo* se podrían utilizar de una forma similar a técnicas de formación de imágenes de medicina nuclear para detectar tejidos, células, u otro material que expresa el antígeno NYESO-1. De esta forma, en una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo de la presente invención o fragmento de unión del mismo para la preparación de una composición para la detección *in vivo* o apuntamiento de un agente terapéutico y/o diagnóstico a un tumor.

Por otra parte, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo o fragmento de unión, o el polinucleótido, vector o célula de la invención. La composición de la presente invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "derivado químico" describe una molécula que contiene fracciones químicas adicionales que normalmente no forman parte de la molécula base. Dichas fracciones pueden mejorar la solubilidad, la vida media, la absorción, etcétera, de la molécula base. Alternativamente, las fracciones pueden atenuar los efectos secundarios no deseables de la molécula base o reducir la toxicidad de la molécula base. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes anti-tumorales adicionales tales como interleucina o interferones en función del uso deseado de la composición farmacéutica. Por lo tanto, en una realización preferida particular la presente invención se refiere al uso del anticuerpo o fragmento de unión de la presente invención, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención para tratar o prevenir el desarrollo de un tumor; para la mejora de síntomas asociados a un tumor; para diagnosticar o cribar un sujeto en relación con la presencia de un tumor o para determinar el riesgo de desarrollar un tumor. Dicha composición farmacéutica se puede diseñar para ser administrada por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, parenteral o como aerosol; véase también más adelante.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar o prevenir el desarrollo de un tumor en un sujeto; para mejorar los síntomas asociados a un tumor; para diagnosticar o cribar un sujeto en relación con la presencia de un tumor o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar un tumor, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de uno cualquiera de los anticuerpos, polinucleótidos, vectores o células descritos anteriormente de la presente invención. En particular, las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico de acuerdo con la presente invención incluyen melanoma y cáncer de mama, y son más adecuadas para utilizarse en el apuntamiento a un tumor que comprende carcinoma de mama primario y/o metástasis. Salvo que se indique lo contrario, los términos "tumor", "cáncer", "carcinoma" y similares se utilizan en la presente de manera intercambiable.

Por tanto, la presente exposición abarca cualquier uso de una molécula de unión a antígeno tumoral que comprende al menos una CDR del anticuerpo humano anteriormente descrito en particular para diagnosticar y/o tratar un trastorno relacionado con un tumor. Preferentemente, dicha molécula de unión es un anticuerpo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo. Además, la presente descripción se refiere a anticuerpos anti-idiotípicos de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados y descritos anteriormente en la presente. Estos son anticuerpos u otras moléculas de unión que se unen a la secuencia peptídica antigénica única ubicada en una región variable de un anticuerpo cerca del sitio de unión a antígenos.

En otra realización, la presente descripción se refiere a una composición para diagnóstico que comprende uno cualquiera de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígenos, polinucleótidos, vectores o células de la invención descritos anteriormente y opcionalmente medios adecuados de detección tales como reactivos utilizados convencionalmente en métodos de inmunodiagnóstico o de diagnóstico basado en ácidos nucleicos. Los anticuerpos de la invención, por ejemplo, son adecuados para utilizarse en inmunoensayos en los cuales se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un vehículo de fase sólida. Los ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato o bien directo o bien indirecto. Los ejemplos de dichos inmunoensayos son radioinmunoensayo (RIA), de tipo en emparedado (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y análisis Western blot. Los antígenos y anticuerpos de la invención pueden estar unidos a

muchos vehículos diferentes y se pueden utilizar para aislar células específicamente unidas a los mismos. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, agarosas, y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser o bien soluble o bien insoluble a efectos de la invención. Existen muchas

5 marcas y métodos de marcación diferentes conocidos por aquellos con conocimientos habituales en la técnica. Los ejemplos de los tipos de marcas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, y compuestos bioluminiscentes; véanse también las realizaciones que se han descrito anteriormente en la presente.

10 Mediante una realización adicional, los anticuerpos de unión de la presente invención también se pueden utilizar en un método para el diagnóstico de un tumor en un individuo al obtener una muestra de flujo corporal del individuo sometido a prueba, que puede ser una muestra sanguínea, una muestra linfática o cualquier otra muestra de flujo corporal, y poner en contacto la muestra de flujo corporal con un anticuerpo de la presente invención bajo condiciones que permitan la formación de complejos de anticuerpo-antígeno. El nivel de estos complejos se

15 determina a continuación mediante métodos conocidos en la técnica, un nivel significativamente mayor que el formado en una muestra de control que indica el tumor en el individuo bajo prueba. De la misma forma, también se puede utilizar el antígeno específico unido por los anticuerpos de la invención. De esta forma, la presente descripción se refiere a un inmunoensayo in vitro que comprende el anticuerpo o el antígeno de la invención. Una realización preferida de la presente descripción se refiere a la determinación de cáncer, melanoma y cáncer de

20 mama en particular. Los métodos implican realizar ensayos en relación con el NY-ESO-1.

En una realización, la presente descripción se refiere a un método para determinar el estado de una condición cancerosa, por ejemplo, regresión, progresión de aparición de una condición cancerosa en un paciente con un tumor que exprese el antígeno del (asociado al) tumor NY-ESO-1, que comprende someter a ensayo una muestra tomada

25 de dicho paciente en relación con anticuerpos que se unen específicamente a dicho antígeno, y comparar un valor obtenido con un valor anterior obtenido tras el ensayo de una muestra anterior tomada de dicho paciente, de manera que cualquier diferencia entre ellas es indicativa de un cambio en el estado de dicha condición cancerosa. Un método correspondiente que se puede utilizar de acuerdo con la presente descripción se da a conocer en la solicitud internacional WO01/07917. Alternativamente, dicho método se puede llevar a cabo con un anticuerpo de la presente

30 invención.

En otra realización, la presente descripción se refiere a un método para determinar células cancerosas, por ejemplo, células de cáncer de mama en una muestra que comprende someter a ensayo dicha muestra en relación con la expresión de NY-ESO-1 realizando ensayos en relación con la presencia de la proteína NY-ESO-1 con un

35 anticuerpo de la presente invención, en donde la expresión de NY-ESO-1 es indicativa de la presencia de células cancerosas en dicha muestra. Un método similar que se puede adaptar de acuerdo con la presente descripción se describe en la patente US n.º 6.338.947 para SCP-1, NY-ESO-1 y SSX-2.

En este contexto, la presente exposición se refiere también medios específicamente diseñados para este fin. Por ejemplo, se puede utilizar una matriz basada en proteínas o anticuerpos, que por ejemplo se carga con el antígeno de la presente exposición con el fin de detectar anticuerpos que pueden estar presentes en pacientes que padecen un tumor, en particular metástasis, o con anticuerpos o fragmentos de unión de la presente invención. El diseño de inmunoensayos con micromatrices se resume en Kusnezow et al., Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696. Por

40 consiguiente, la presente exposición se refiere también a micromatrices cargadas con anticuerpo o antígeno de la presente exposición.

La presente invención también proporciona un envase o estuche de ensayo farmacéutico y diagnóstico, respectivamente, que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, es decir anticuerpo o fragmento del mismo de unión, polinucleótido, vector o célula de la presente

50 invención. Asociado a dicho(s) recipiente(s) se puede encontrar un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación, por parte de la agencia, de la fabricación, el uso o venta para administración humana. Además, o alternativamente, el estuche de ensayo comprende reactivos y/o instrucciones para su uso en ensayos diagnósticos adecuados. Evidentemente, la composición, es decir, el estuche de ensayo de la presente invención particularmente

55 adecuado para el diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno al que acompañe la presencia del antígeno asociado a tumor NY-ESO, en particular aplicable para el tratamiento de tumores según se ha mencionado anteriormente.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se utilizan en la presente para significar en general la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcial o totalmente una enfermedad y/o un efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" en el sentido en que se utiliza en la presente cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular un humano, e incluye: (a) prevenir que aparezca la enfermedad en un sujeto que pueda estar predispuesto a la misma pero cuya presencia no hay sido diagnosticada todavía; (b) inhibir la enfermedad, es decir detener su desarrollo; o

60 (c) aliviar la enfermedad, es decir provocar la regresión de la enfermedad. Además, el término "sujeto" o "paciente"

65

se refiere a un mamífero, preferentemente un humano, que necesita tratamiento para una condición, trastorno o enfermedad.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica; véase por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) de la University of Sciences en Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etcétera. Las composiciones que comprenden estos vehículos se pueden formular mediante métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar de diferentes formas, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Las formulaciones en aerosol tales como formulaciones de pulverización nasal incluyen soluciones acuosas purificadas, u otras, del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Estas formulaciones preferentemente se ajustan a un pH y estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar en forma de un supositorio con un vehículo adecuado.

20 El régimen de dosificación será determinado por el médico responsable y por factores clínicos. Como es bien conocido en las artes médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área de la superficie corporal, edad, el compuesto particular que se administrará, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administren simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1.000 µg (o de ácido nucleico para la expresión o para la inhibición de la expresión en este intervalo); no obstante, se prevén dosis inferiores o superiores a este intervalo ilustrativo, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente. En general, el régimen como administración regular de la composición farmacéutica debería estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg unidades por día. Si el régimen es una infusión continua, también debería estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. Mediante evaluación periódica se puede monitorizar la evolución. Las preparaciones para administración parenteral incluyen emulsiones, suspensiones, y soluciones no acuosas o acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, entre las que se incluyen solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución láctica de Ringer, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los correspondientes basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes adicionales tales como agentes anti-tumorales y fármacos citotóxicos, en función del uso deseado de la composición farmacéutica. Además, la composición farmacéutica también se puede formular como vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo de la presente invención para inmunización pasiva o antígeno afín para inmunización pasiva. Las formulaciones de vacuna para el tratamiento de cáncer que utiliza antígenos asociados a tumor, tales como NYESO-1, se describen por ejemplo en la solicitud internacional WO2005/105139. Además, puede resultar deseable la coadministración o administración secuencial de otros agentes.

45 Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad del ingrediente activo suficiente para mejorar los síntomas o condición. La eficacia terapéutica y toxicidad de estos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en por lo menos el 50% de la población) y LD50 (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y el mismo se puede expresar como la relación, LD50/ED50. Preferentemente, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para prevenir la metástasis y el crecimiento neoplásico de células.

55 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención preferentemente se pueden utilizar para el tratamiento de tumores y cáncer incluyendo, aunque sin carácter limitativo, melanoma, cáncer de mama primario, carcinoma hepatocelular y metástasis.

60 Estas y otras realización se exponen y están abarcadas por la descripción y ejemplos de la presente exposición. Bibliografía adicional referente a uno cualquiera de los materiales, métodos, usos y compuestos a usar de acuerdo con la presente invención se puede recuperar de bibliotecas y bases de datos públicas, usando por ejemplo dispositivos electrónicos. Por ejemplo, se puede utilizar la base de datos pública "Medline", a la que da alojamiento el National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine en el National Institutes of Health. Otras bases de datos y direcciones web, tales como las correspondientes del European Bioinformatics Institute (EBI), que forma parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL), son conocidas por los expertos en la técnica y también se pueden obtener utilizando motores de búsqueda en internet. En Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 se proporciona una visión general de información de patentes en biotecnología y un sondeo de fuentes relevantes de información de patentes útiles para una búsqueda retrospectiva y para el conocimiento actual.

La exposición anterior en general describe la presente invención. Salvo que se indique lo contrario, a un término, según se usa en la presente, se le asigna la definición que se proporciona en el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reeditado en 2003, ISBN 0 19 850673 2.

5 En la totalidad del texto de esta memoria descriptiva se citan varios documentos. Se pueden encontrar citas bibliográficas completas al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Se puede obtener una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en la presente con fines ilustrativos únicamente y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

### Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, aunque no deberían interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la invención. Se pueden encontrar en la bibliografía citada descripciones detalladas de métodos convencionales, tales como aquellos utilizados en la presente; véase también "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" decimoséptima Ed. ed por Beers and Berkow (Merck & Co., Inc. 2003).

20 La práctica de la presente invención utilizará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que se sitúan dentro de los conocimientos de la técnica. Para una elaboración adicional de técnicas generales útiles en la práctica de esta invención, el profesional puede remitirse a libros de texto e informes convencionales en biología celular y cultivo de tejidos; véanse también las referencias citadas en los ejemplos. Se pueden encontrar métodos generales en bioquímica molecular y celular en libros de texto convencionales tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames and Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller and Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición (Ausubel et al., eds.); y Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller and Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu et al., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I - IV (Weir and Blackwell, eds., 1986). Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); y Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Los reactivos, vectores de clonación y estuches de ensayo para la manipulación genética a la que se hace referencia en esta exposición están disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich, y ClonTech. Las técnicas generales en cultivo celular y recolección de medios se expresan en líneas generales en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch et al., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzel et al., CHAOS 11 (2001), 98-107.

### Métodos complementarios

#### Material del paciente

50 Se congeló material tumoral así como tejido normal no necesario para el análisis histopatológico rutinario en nitrógeno líquido. Se recolectaron suero y sangre para el aislamiento de células B de memoria del paciente C1 de acuerdo con el consentimiento informado que fue aprobado por el comité ético local y firmado por el paciente.

#### 55 Cultivo de células B de memoria

Mediante un procedimiento de selección de dos etapas se aislaron células B de memoria con respecto a linfocitos humanos de sangre periférica. Se utilizó el marcador CD22 de células pan-B para la selección positiva de células B utilizando la tecnología MACS (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). Los PBL se marcaron utilizando mAbs CD22 anti-humanos conjugados con MACS, mAbs conjugados con ficoeritrina IgD antihumano y anticuerpos conjugados con APC IgM, IgA, CD3, CD8, CD56 anti-humano (Becton Dickinson, Basel, Suiza). Células pan-B se aislaron mediante la selección positiva de células positivas para CD22 utilizando un dispositivo Midi MACS y columnas de LS (Miltenyi) seguida por la selección de células negativas para ficoeritrina y APC utilizando un clasificador de células MoFlo (DakoCytomation, Fort Collins, USA). Células B positivas para CD22 y negativas para IgM, IgD, e IgA se incubaron a continuación con EBV que contenía materia sobrenadante obtenido de células B95-8 en presencia de CpG 2006 (6, 15) en medio de células B que contenía RPMI 1640 complementado con suero fetal de ternera al 10%.

## ES 2 637 214 T3

Se sembraron células a 50 células por pocillo en medio de células B sobre 30.000 PBL de soporte (feeder PBL) irradiados, preparados a partir de donantes voluntarios.

- 5 Después de 2 semanas de cultivo, el medio condicionado de cultivos de células B de memoria se cribó en relación con la presencia de anticuerpos específicos del NY-ESO-1 mediante ELISA y sobre secciones de tejido autólogas y no autólogas positivas para NY-ESO-1.

### ELISA

- 10 Se recubrieron microplacas de pocillos en tiras de 96 pocillos (Corning, NY, USA) con 25 µl/pocillo de 1 µg/ml de proteína NY-ESO-1 recombinante en PBS durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBS-T y se bloquearon durante la noche a 4°C con PBS que contenía 5% leche en polvo (Rapilait, Migros, Suiza). Se incubaron preparaciones de medio condicionado de células B, suero del paciente y anticuerpos recombinantes durante 2 h a temperatura ambiente. La unión de anticuerpos humanos a NY-ESO-1 se determinó utilizando un anticuerpo secundario IgG-HRP anti-humano de burro (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK) seguida por la medición de la actividad de HRP usando una solución de sustrato TMB (TMB, Sigma, Buchs, Suiza).

### ELISA de mapeo de epítopos

- 20 Se utilizaron péptidos 20-meros que abarcan la proteína NY-ESO-1 completa con solapamientos 10 aa compartidos por cada uno de los péptidos adyacentes (Peptides&Elephants, Nuthetal, Alemania) para recubrir placas ELISA Maxisorp (Nunc, Rochester, NY). Se detectó anticuerpo recombinante humano Manhattan o suero del paciente (diluido 1:500 en PBS) usando IgM+IgG anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch).

- 25 ELISA de competición

- 30 Experimentos de saturación identificaron la concentración de unión máxima mitad del anticuerpo monoclonal humano Manhattan para el péptido NY-ESO-111-30 como  $1 \times 10^{-9}$  M ó 0,15 µg/ml. En experimentos de competición, concentraciones crecientes del péptido NY-ESO-111-30 se mezclaron con Manhattan a una concentración de 0,15 µg/ml y la mezcla se transfirió a continuación a placas ELISA recubiertas con NY-ESO-111-30.

### Inmunohistoquímica

- 35 Se troquelaron cilindros de tejidos tumorales que medían 0,6mm de diámetro a partir de tejido tumoral positivo para NY-ESO-1 embebido en parafina y tejido testigo sano. Se colocaron pares formados por un cilindro de tejido tumoral y por tejido testigo sano en cada posición de una rejilla 2x4 cuyas dimensiones eran compatibles con el formato de microtitulación de las placas de cultivo de células B y pipetas multicanal convencionales.

- 40 Se realizó inmunohistoquímica en tejido embebido en parafina y fijado con formalina.

- 45 En todos los portaobjetos se aplicó recuperación de antígenos basada en calor. Se bloqueó la fluorescencia no específica usando IgG anti-humano policlonal de conejo (Dako, Baar, Suiza) durante 30 min a temperatura ambiente seguida por un segundo bloque en 1% de leche baja en grasa (Rapilait, Migros, Suiza) durante 10 min. El medio condicionado con anticuerpo primario o células B se incubó durante la noche a 4 °C. Se puso de manifiesto la unión de anticuerpos humanos a NY-ESO-1 usando anticuerpos secundarios conjugados con Cy 3 para IgG humano (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Soham, UK). La tinción de anticuerpo humano recombinante biotilado Manhattan se puso de manifiesto usando estreptavidina conjugada con Cy3 o con HRP (Sigma, Buchs, Suiza). Como testigo positivo para la presencia de antígeno NY-ESO-1 se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-NY-ESO-1 de ratón (Zymed, South San Francisco, USA).

Se efectuó un análisis de inmunofluorescencia en un microscopio de fluorescencia invertido (Leica, Heerbrugg, Suiza).

- 55 RT-PCR de células individuales

- 60 Se depositaron células individuales obtenidas de un cultivo de células B de memoria en tubos para PCR. Se preparó ADNc utilizando cebadores específicos para las regiones constantes de cadenas pesadas, ligeras  $\gamma$  y ligeras  $\delta$  de inmunoglobulina G. La amplificación PCR de regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina se realizó de acuerdo con protocolos convencionales (7, 16). Se amplificaron regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina utilizando un planteamiento de PCR semi-anidada. La PCR de la 1ª ronda se realizó con cebadores específicos para la región constante de IgG y reservas de cebadores específicos para regiones de armazón 1 conservadas de las familias de región variable de cadena pesada y ligera de Ig (7). Posteriormente, se usó tal como se describe una PCR semi-anidada con cebadores anidados específicos para la región constante de IgG y cebadores específicos para el armazón 1 de las familias de región variable Ig de cadena pesada y ligera que contenían sitios de restricción (8). Los productos de PCR de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina se clonaron

en vectores que contenían la región constante de IgG1, IgKappa o IgLambda.

Producción y purificación de anticuerpos

5 Se cultivaron células de riñón embrionario humano 293-T en DMEM complementado con FCS con IgG ultrabaja 10%, penicilina-estreptomina 1% y L-glutamina 1% (Invitrogen, Basel, Suiza). La co-transfección con ADN plásmido codificante de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina se realizó mediante el método convencional de precipitación con fosfato de calcio. Después de esto las células se cultivaron en D-MEM libre de suero  
10 complementado con Nutridoma SP 1% (Roche, Rotkreuz, Suiza). Se recolectaron materias sobrenadantes después de 8 días de cultivo y se purificó IgG en una columna de proteína G (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia) utilizando cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia). El anticuerpo Manhattan purificado se biotiniló siguiendo las instrucciones de los fabricantes (SIGMA, Buchs, Suiza).

15 Inmunofluorescencia en células tumorales SK-MEL-37

Células SK-MEL-37 se desarrollaron en un portaobjetos de microscopio, se fijaron con formaldehído y se permeabilizaron con Tritón X-100 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de un bloqueo con suero de cabra 10% durante 1h a RT (temperatura ambiente), se incubaron células con Manhattan a una concentración de 1 ug/ml o anticuerpo testigo negativo (hu8-18c5 (17) expresado de forma recombinante con una región Fc humana) en PBS / suero de cabra 1% / Triton X-100 0,2% durante la noche a 4°C. Los anticuerpos unidos  
20 se visualizaron mediante tinción con IgG anti-humano de cabra Alexa Fluor@ 546 (1:300, Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) durante 1 h a TA. La microscopía se llevó a cabo utilizando un microscopio Leica SP 5.

25 Ejemplo 1: Identificación de células B específicas del NY-ESO-1 a partir de PBL de un paciente con melanoma

Se seleccionó un paciente con melanoma con un título sérico para el taa NY-ESO-1 en ELISA y en secciones autólogas de ganglio linfático obtenidas en biopsia. Tras vacunación con virus vaccinia recombinante que expresa NY-ESO-1 de longitud completa se observó una respuesta clínica parcial demostrada por la regresión de dos metástasis positivas para NY-ESO-1 en el hígado. Se recolectaron 50 ml de sangre periférica del paciente, y cse  
30 aislaron y cultivaron células B doble- negativas para IgM/IgD de superficie que representan las células B de memoria Ig-conmutadas después de la inmortalización utilizando un protocolo de transformación con virus Epstein Barr modificado (6). Se obtuvieron 100.000 células B de memoria y las mismas se sembraron en plantillas de microtitulación de 96 pocillos a 50 células por pocillo. Después de 3 semanas de cultivo, se observaron clones desarrollándose en los pocillos de cultivo y el medio condicionado por los cultivos de células B se sometió a ensayo  
35 en relación con la presencia de anticuerpos específicos del NY-ESO-1. Como primera criba, se llevó a cabo un ELISA utilizando NY-ESO-1 de longitud completa recombinante como antígeno. Las señales ELISA se clasificaron como positivas si superaban la señal de fondo en un factor de tres. Esto identificó 9 pocillos de cultivo de células B de memoria positivos para ELISA de entre el total de 2.000 pocillos. En la Figura 1A se representa un ejemplo de la relación de señal/ruido obtenida con el ELISA. Los cultivos positivos para ELISA se sometieron a ensayo  
40 posteriormente en inmunohistoquímica utilizando tejido tumoral positivo para NY-ESO-1. La configuración de la criba de tejidos consistía en 8 pares de barras de tejido de tumores de mama positivos para NY-ESO-1 y tejido de mama sano como testigos montados sobre portaobjetos de vidrio. Debido a la miniaturización de este ensayo, resultaron suficientes 15 µl de medio condicionado por células B para realizar el ensayo. La capacidad de comparar el medio condicionado de diversos cultivos de células B de memoria y de testigos negativos en un portaobjetos individual  
45 facilitó la evaluación de la tinción por fluorescencia.

La evaluación de los 9 cultivos de células B positivos para ELISA en este ensayo de tejidos identificó un cultivo que producía una intensidad de tinción superior en comparación con la de los otros 8. Esto se ilustra en la Figura 1B, donde inmunofluorescencia obtenida con cultivo reactivo a tejido 12D7 se compara con la inmunofluorescencia  
50 obtenida con el pocillo 9D1 el cual se clasificó como no reactivo a tejido.

Puesto que en la etapa de clonación molecular se habría perdido información de la subclase IgG sobre el anticuerpo específico para NY-ESO-1, se determinó en esta etapa el uso de inmunohistoquímica con secciones de tejido  
55 positivas para NY-ESO-1 en combinación con anticuerpos secundarios específicos de subclase IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 antihumanos. Tal como se muestra en la Figura 1C, la tinción de tejidos para NY-ESO-1 se observa únicamente con un anticuerpo secundario anti IgG1.

60 Ejemplo 2: Clonación molecular de un anticuerpo específico para el NY-ESO-1, secretado por células B de memoria cultivadas

Intentos anteriores de clonación celular de células B de memoria, humanas, transformadas por EBV y específicas de antígenos, identificadas, no habían tenido éxito. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención se emprendió una estrategia de clonación molecular basada en una RT-PCR de células clasificadas individuales recolectadas del pocillo 12D7 con el fin de aislar el clon del anticuerpo responsable del patrón de tinción descrito anteriormente. Se  
65 recolectaron 32 células y las mismas se depositaron como células individuales directamente en tubos para PCR.

Después de la síntesis del ADNc, las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana se amplificaron utilizando un planteamiento de PCR anidada (7). Se obtuvieron secuencias de cadena pesada y ligera kappa con 16 de las 32 células clasificadas. La PCR para secuencias variables de cadena ligera lambda no proporcionó ningún producto con ninguna de las células. El análisis de secuencia identificó 4 clones de anticuerpo diferenciados que se numeraron de acuerdo con su abundancia relativa. El clon 1 se encontró en ocho de las 16 células, el clon 2 en cuatro células y los clones 3 y 4 cada uno en dos células.

A continuación, se determinó si uno de estos cuatro clones, cuando se expresa como anticuerpo recombinante, produjo una tinción de NY-ESO-1 similar a la que se observó con medio condicionado proveniente del pocillo 12D7 de cultivo de células B. Con este fin, las secuencias variables de cadena pesada y ligera se clonaron en vectores de expresión de anticuerpos que proporcionaron las regiones constantes de la cadena pesada de IgG1 humana y de la cadena ligera kappa humana (8). Las regiones constantes de IgG1 se utilizaron ya que se determinó que el anticuerpo específico de NY-ESO-1 identificado en medio condicionado del pocillo 12D7 era de esta subclase (Fig. 1 C).

Se realizó un análisis funcional de los cuatro clones volviendo a cribar los anticuerpos recombinantes en ELISA y en secciones de tejido positivas para NY-ESO-1. Con este fin, la cadena pesada y los vectores de expresión de cadena ligera correspondientes de los cuatro clones se transfectaron en células 293 HEK y el fluido sobrenadante de las células transfectadas se sometió a prueba directamente en ELISA e inmunohistoquímica. La totalidad de los cuatro fluidos de sobrenadante produjeron IgG1 funcional tal como se comprobó en ELISA con IgG anti-humano. Mientras que los clones 1 a 3 no mostraron ninguna unión a NY-ESO-1 en ELISA el clon número 4 fue positivo hasta la última dilución sometida a prueba (1/100) (Fig. 2 A). Este clon también mostró una tinción específica en inmunohistoquímica utilizando secciones de tejido positivas para NY-ESO-1 (Fig. 2 B).

Esto se consideró como la confirmación de que se había recuperado la secuencia de las regiones variables de inmunoglobulina del anticuerpo original específico de NY-ESO-1 tal como apareció en el paciente. Para simplificar, el clon 12D7 n.º4 se denominó "Manhattan" y el mismo se utilizó para caracterización adicional utilizando material purificado de proteína G obtenido a partir de células HEK transfectadas transitoriamente.

Ejemplo 3: El anticuerpo monoclonal humano específico de NY-ESO-1 Manhattan se une al péptido NY-ESO-1<sup>111</sup> con una KD de  $10^{-10}$

Para identificar el epítipo reconocido por Manhattan en NY-ESO-1 se llevó a cabo un ELISA utilizando péptidos solapantes que abarcan la proteína NY-ESO-1 completa. Como se muestra en la Figura 3A, el Manhattan se une a un péptido que representa los aminoácidos 11 a 30 de la proteína NY-ESO-1 pero no a los dos péptidos adyacentes que abarcan los aminoácidos 1 a 20 ó 21 a 40. Esto sugiere que el epítipo reconocido por Manhattan se sitúa en la unión de estos dos péptidos en torno al aminoácido 20 de NY-ESO-1. Este epítipo, entre otros, también fue reconocido por anticuerpos contenidos en suero del paciente C1 (Fig. 3B). La avidéz del Manhattan se determinó mediante ELISA de competición utilizando concentraciones crecientes del péptido NY-ESO-111-30 soluble para competir por el péptido unido a la placa. Tal como se representa en la Figura 3C, la constante de disociación (KD) en equilibrio, de unión a antígenos, de la interacción del Manhattan con su péptido cognado se situaba fue en la parte inferior de los valores nanomolares.

Como ensayo final utilizado en la caracterización del anticuerpo monoclonal humano Manhattan se llevó a cabo un análisis de inmunofluorescencia sobre la línea celular SK-MEL-37 positiva para NY-ESO-1 (9). La tinción de esta línea celular con Manhattan dio como resultado una señal nuclear que se co-localizó con tinción obtenida con el marcador nuclear Hoechst.

#### Conclusión

Los experimentos anteriores proporcionan un método general para la identificación y clonación molecular de anticuerpos directamente de linfocitos de sangre periférica (PBLs) de sujetos humanos. El método de la presente invención se pudo demostrar aislando un anticuerpo monoclonal humano para el antígeno asociado a tumor NY-ESO-1 de un paciente con melanoma. Comenzando con el cribado de anticuerpos secretados por cultivos de células B de memoria humanas inmortalizadas a corto plazo, se identificaron cultivos que dieron positivos en ELISA y en inmunohistoquímica en tejido positivo para NY-ESO-1. A esta criba primaria le sucedió una etapa de clonación molecular cuya finalidad era identificar y aislar el clon individual de células B que secretó el anticuerpo detectado en la criba primaria. La presencia de solamente 4 clones diferentes en el pocillo 12D7 según se puso de manifiesto por análisis de secuencia después de RT-PCR de células individuales sugiere que, de las 50 células inicialmente que se sembraron únicamente unas pocas se habían inmortalizado y sobrevivido.

Una criba secundaria subsiguiente de los anticuerpos candidatos recombinantes dio como resultado la identificación de un anticuerpo monoclonal individual con un patrón de tinción idéntico al del anticuerpo original que fue producido por células B de memoria cultivadas derivadas de los PBL del paciente. De esta forma, se pudo recuperar con éxito un anticuerpo tal como apareció originalmente en el paciente. Este anticuerpo, acuñado como "Manhattan", reconoce un epítipo N-terminal en torno a la posición 20 del aminoácido que está compartida entre el NY-ESO-1 y

el taa LAGE-1 (9). Este epítipo también es reconocido por suero del paciente C1 dando fundamento a la noción de que el Manhattan es una copia genuina de un anticuerpo que se produjo en el paciente.

5 Hasta la fecha, el Manhattan es el primer anticuerpo monoclonal humano para NY-ESO-1 también puede que sea el primer anticuerpo con afinidad madurada derivado del paciente para un antígeno tumoral y un taa, respectivamente. Este método novedoso de la presente exposición elude algunas de las dificultades inherentes a la transformación con EBV de células B, tales como la inestabilidad genética y una eficiencia de clonación deficiente (6, 10). Aunque el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos de células B de memoria inmortalizadas con EBV se había realizado con éxito en un estudio anterior (6), merece la pena mencionar que intentos previos, probados antes que el método descrito anteriormente de la presente exposición, para el aislamiento de anticuerpos específicos del NY-ESO-1 provenientes del mismo paciente utilizando transformación con EBV y técnicas de clonación celular, fracasaron a pesar de un número considerable de cultivos de células B de memoria identificados en la criba celular.

15 Un segundo objetivo de la presente exposición fue el aislamiento de un anticuerpo para el antígeno NY-ESO-1 asociado a tumor con reactividad a tejidos. Esto fue motivado por la observación de que suero del paciente contenía anticuerpos que reaccionaban con tejido autólogo positivo para NY-ESO-1 tomado en biopsia. Con este fin, la tecnología de micromatrices se adaptó para la criba de cultivos de células B de memoria. Esto presentaba varias ventajas en comparación con métodos clásicos de inmunohistoquímica. En primer lugar, la disponibilidad, en un único portaobjetos, de varias posiciones duplicadas que permiten someter a ensayo y comparar varias muestras. En segundo lugar, la posibilidad de colocar tejido positivo de manera adyacente a tejido negativo mejora considerablemente la sensibilidad del ensayo, una característica que resultó crucial debido a que la incubación con medio condicionado de cultivos de células B de memoria a menudo daba como resultado una tinción muy débil. En tercer lugar, esta miniaturización del formato del ensayo necesita mucho menos del medio condicionado lo cual también es un factor decisivo ya que el volumen de cultivo correspondiente a cultivos de células B de memoria en general fue menor de 200  $\mu$ l.

30 La observación de que suero del paciente y anticuerpo monoclonal humano Manhattan reconocieron secciones de tejido fijadas puede ser irrelevante para la situación in vivo por lo menos con respecto a una función terapéutica directa mediante la inducción de mecanismos inmunoeffectores inducidos por anticuerpos que actúan a un nivel celular para despejar células positivas para NY-ESO-1. El NY-ESO-1 se ha descrito como un antígeno intracelular (11) y en este estudio se mostró que está localizado en el núcleo, por lo menos en la línea celular SK-Me-37. En este contexto, la tinción superficial sobre SK-Me-37 viva utilizando Manhattan biotinilado había resultado negativa.

35 El aislamiento del Manhattan constituye un paso importante hacia la evaluación de la importancia terapéutica de anticuerpos específicos de tumor, derivados del paciente. Existen varios escenarios concebibles de acuerdo con los cuales un anticuerpo de este tipo podría mediar efectos terapéuticos. En primer lugar, podría servir como adyuvante para futuros protocolos de vacunas. Complejos inmunitarios formados tras la co-administración de Manhattan con NYESO-1 podrían dar como resultado un incremento de la inducción de respuestas inmunes celulares (12).

40 Una segunda posibilidad aborda la función patofisiológica de esta clase de anticuerpos en pacientes con tumores. NYESO-1 con frecuencia induce respuestas humorales que se correlacionan con un mal pronóstico para el paciente (13). Aunque esto podría ser una mera correlación debido a la abundancia potenciada del antígeno a medida que el tumor crece, también se podría plantear como hipótesis una función tolerogénica de esta respuesta de las células B. De acuerdo con este escenario, antígeno libre liberado por células tumorales necróticas o apoptóticas induciría una fuerte respuesta de las células B, y a continuación las células B presentarían antígeno como resultado de la absorción, mediada por receptores Fc, de complejos inmunitarios (14). En la medida en la que las células B pueden ser APC deficientes, esta presentación podría dar como resultado la inducción de tolerancia de células T reactivas a NY-ESO-1 y prevenir así el rechazo tumoral. La administración, en una fase temprana de desarrollo del tumor, de F(ab)s de Manhattan recombinante podría interrumpir la absorción de antígeno por células B debido a que a los F(ab) no se les unen receptores Fc aunque seguirían capturando antígenos. Esto a su vez, podría evitar la inducción de tolerancia en células T específicas de NY-ESO-1.

## Referencias

- 55 1. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 11810-11813, 1995.
- 60 2. Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L. J., and Knuth, A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*, 187: 265-270, 1998.
- 65 3. Stevenson, F. K. Update on cancer vaccines. *Curr Opin Oncol*, 17: 573-577, 2005.
4. Davis, I. D., Chen, W., Jackson, H., Parente, P., Shackleton, M., Hopkins, W., Chen, Q., Dimopoulos, N., Luke, T.,

- 5 Murphy, R., Scott, A. M., Maraskovsky, E., McArthur, G., MacGregor, D., Sturrock, S., Tai, T. Y., Green, S., Cuthbertson, A., Maher, D., Miloradovic, L., Mitchell, S. V., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Chen, Y.-T., Gnjatic, S., Hoffman, E. W., Old, L. J., and Cebon, J. S. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4+ and CD8+ T cell responses in humans. PNAS 10.1073/, 101: 10697-10702, 2004.
5. Harris, M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. The Lancet Oncology, 5: 292, 2004.
- 10 6. Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M. R., Murphy, B. R., Rappuoli, R., and Lanzavecchia, A. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. Nat Med, 10: 871-875, 2004.
- 15 7. Owens, G. P., Ritchie, A. M., Burgoon, M. P., Williamson, R. A., Corboy, J. R., and Gilden, D. H. Single-Cell Repertoire Analysis Demonstrates that Clonal Expansion Is a Prominent Feature of the B Cell Response in Multiple Sclerosis Cerebrospinal Fluid. J Immunol, 171: 2725-2733, 2003.
8. Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., and Nussenzweig, M. C. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science, 301: 1374-1377, 2003.
- 20 9. Chen, Y. T., Gure, A. O., Tsang, S., Stockert, E., Jager, E., Knuth, A., and Old, L. J. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 6919-6923, 1998.
- 25 10. Kuppers, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. Nat Rev Immunol., 3: 801-812, 2003.
11. Schultz-Thater, E., Noppen, C., Gudat, F., Durmuller, U., Zajac, P., Kocher, T., Heberer, M., and Spagnoli, G. C. NY-ESO-1 tumour associated antigen is a cytoplasmic protein detectable by specific monoclonal antibodies in cell lines and clinical specimens. Br J Cancer, 83: 204-208, 2000.
- 30 12. Woelbing, F., Kostka, S. L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A. P., Knop, J., Udey, M. C., and von Stebut, E. Uptake of Leishmania major by dendritic cells is mediated by Fc{gamma} receptors and facilitates acquisition of protective immunity. J. Exp. Med., 203: 177-188, 2006.
- 35 13. Jager, E., Stockert, E., Zidianakis, Z., Chen, Y. T., Karbach, J., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Old, L. J., and Knuth, A. Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events. Int J Cancer, 84: 506-510, 1999.
- 40 14. Preiss, S., Kammertoens, T., Lampert, C., Willimsky, G., and Blankenstein, T. Tumor-induced antibodies resemble the response to tissue damage. Int J Cancer, 115: 456-462, 2005.
15. Hartmann, G. and Krieg, A. M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. J Immunol, 164: 944-953, 2000.
- 45 16. Barbas III, C. F. Phage Display A Laboratory Manual., Dennis R.Burtoon, Jamie K.Scott & Gregg J.Silverman (eds.)2001). Dennis R.Burtoon, Jamie K.Scott & Gregg J.Silverman (eds.) 2001), 2001.
17. Schluesener, H. J., Sobel, R. A., Lington, C., and Weiner, H. L. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. J Immunol, 139: 4016-4021, 1987.
- 50

**Listado de secuencias**

- <110> University of Zurich
- 55 <120> Monoclonal human tumor-specific antibody
- <130> UN12A01/P-WO
- <150> EP 12 151 047.3
- <151> 2007-03-13
- <160> 11
- 60 <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 354
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- 65 <220>
- <221> V\_region

ES 2 637 214 T3

```

<222> (1)..(354)
<223> 12D7-variable heavy (Vh) chain sequence
<220>
<221> CDS
5 <222> (1)..(354)
<400> 1
cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc gtg gta cgg cct ggg ggg      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1                               5                               10
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc agc ttt att gat tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ile Asp Tyr
20                               25                               30
ggc atg agt tgg gtc cgc caa gtt cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc      144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35                               40                               45
gct ggc atg aat tgg agc ggc gat aaa aaa ggt cat gcg gag tct gtg      192
Ala Gly Met Asn Trp Ser Gly Asp Lys Lys Gly His Ala Glu Ser Val
50                               55                               60
aag ggc cga ttc atc att tcc aga gac aac gcc aag aac acc ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                               70                               75                               80
cta gaa atg agc agc cta aga gtc gaa gac acg gcc ctg tat ttt tgt      288
Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys
85                               90                               95
gcg aga ggg gag tat agc aat cgg ttc gac ccc cgg ggc cgg gga acc      336
Ala Arg Gly Glu Tyr Ser Asn Arg Phe Asp Pro Arg Gly Arg Gly Thr
100                               105                               110
ctg gtc acc gtc tcc tca
Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<<210> 2
<211> 118
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ile Asp Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Gly Met Asn Trp Ser Gly Asp Lys Lys Gly His Ala Glu Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Glu Tyr Ser Asn Arg Phe Asp Pro Arg Gly Arg Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

- <210> 3
- <211> 336
- <212> DNA
- 5 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> V\_region
- <222> (1)..(336)
- <223> 12D7-variable kappa light (Vkappa) chain sequence
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(336)
- <400> 3
- <222> (1)..(336)
- 15 <400> 3

gat att gtg atg acc cag act cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

cag ccg gcc tcc ctc tcc tgc agg tct agt caa agc ctc gta ttc act 96  
 Gln Pro Ala Ser Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Thr  
 20 25 30

gat gga aac acc tac ttg aat tgg ttt cag cag agg cca ggc caa tct 144  
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

ES 2 637 214 T3

cca cgg cgc cta att tat aag gtc tct tct cgt gac cct ggt gtc ccc 192  
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Asp Pro Gly Val Pro  
 50 55 60

gac aga ttc agc ggc act ggg tca ggc act gat ttc aca ctg gaa atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile  
 65 70 75 80

agc agg gtg gag gct gag gat att ggg gtt tac tac tgc atg caa ggg 288  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ile Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

acg cac tgg cct ccg att ttt ggc cag ggg acc aag gtg gag atc aaa 336  
 Thr His Trp Pro Pro Ile Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Thr  
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Asp Pro Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ile Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
 85 90 95

Thr His Trp Pro Pro Ile Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 5

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> peptide

<220>

15 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of 12D7 Vh, CDR1

<400> 5

**Asp Tyr Gly Met Ser**  
**1 5**  
 <210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> peptide  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (1)..(17)  
 <223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of 12D7 Vh, CDR2  
 <400> 6  
**Gly Met Asn Trp Ser Gly Asp Lys Lys Gly His Ala Glu Ser Val Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**  
 <210> 7  
 15 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> peptide  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(9)  
 <223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of 12D7 Vh, CDR1  
 <400> 7  
**Gly Glu Tyr Ser Asn Arg Phe Asp Pro**  
 25 **1 5**  
 <210> 8  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> peptide  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(16)  
 35 <223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of 12D7 Vkappa, CDR1  
 <400> 8  
**Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Phe Thr Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn**  
**1 5 10 15**  
 <210> 9  
 <211> 7  
 40 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> peptide  
 <220>  
 45 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of 12D7 Vkappa, CDR2  
 <400> 9  
**Lys Val Ser Ser Arg Asp Pro**  
**1 5**  
 50 <210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55 <223> peptide  
 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> Denomination of CDR protein sequences in Kabat Nomenclature of 12D7 Vkappa, CDR3

<400> 10

**Met Gln Gly Thr His Trp Pro Pro Ile**

5     **1**                                     **5**

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> peptide

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(20)

15 <223> Peptide derived from NY-ESO-1 protein, corresponding to amino acid residues 11 to 30 of the mature NYESO-1 protein; see for example UniProtKB/Swiss-Prot entry under primary accession number P78358

<400> 11

**Ser Thr Gly Asp Ala Asp Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Pro Asp Gly**

**1                                     5                                     10                                     15**

**Pro Gly Gly Asn**

**20**

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humano, humanizado, xenogénico o quimérico humano-murino o fragmento de unión del mismo, que es capaz de reconocer antígeno asociado a tumores NY-ESO-1 y que se une a un epitopo definido por una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N° 11, que comprende en su región de cadena pesada variable que comprende en su región de cadena pesada variable las regiones determinantes de complementariedad CDR1 de ID SEC. n.º: 5, CDR2 de ID SEC n.º: 6 y CDR3 de ID SEC n.º: 7, y en su región de cadena ligera variable las regiones determinantes de complementariedad CDR1 de ID SEC n.º: 8, CDR2 de ID SEC n.º: 9 y CDR3 de ID SEC n.º: 10, o una CDR2 y CDR3 que difieren solamente en uno, dos o tres aminoácidos de las SEC ID N° 6, 7, 9 ó 10.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de la región V<sub>H</sub> (ID SEC n.º: 2) y/o V<sub>L</sub> (ID SEC n.º: 4).
- 15 3. Un polinucleótido que codifica por lo menos las regiones variables del anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 1 ó 2.
4. Un vector, que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3.
- 20 5. Una célula hospedante, que comprende un polinucleótido de la reivindicación 3 o un vector de la reivindicación 4.
6. Un método para preparar un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, comprendiendo dicho método:
- (a) cultivar la célula de la reivindicación 5;
- 25 (b) aislar dicho anticuerpo o fragmento de unión del mismo a partir del cultivo.
7. Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, codificado por el polinucleótido de la reivindicación 3 u obtenible mediante el método de la reivindicación 6.
- 30 8. Una composición, que comprende el anticuerpo o fragmento de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 ó 7, el polinucleótido de la reivindicación 3, el vector de la reivindicación 4 o la célula de la reivindicación 5.
9. La composición de la reivindicación 8, que es una composición farmacéutica y comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 10. Una composición de diagnóstico, que comprende el anticuerpo o fragmento de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 ó 7, el polinucleótido de la reivindicación 3, el vector de la reivindicación 4 o la célula de la reivindicación 5; y opcionalmente reactivos convencionalmente usados en métodos de diagnóstico basados en inmunos o ácidos nucleicos.
- 40 11. Composición farmacéutica o de diagnóstico, que comprende un anticuerpo o fragmento de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 ó 7, el polinucleótido de la reivindicación 3, el vector de la reivindicación 4, la célula de la reivindicación 5, para ser usada en el tratamiento o prevención del progreso de un tumor; para ser usada en la mejora de síntomas asociados con un tumor; para ser usada en el diagnóstico o valoración de un sujeto en cuanto a la presencia de un tumor o para ser usada en la determinación del riesgo de un sujeto para desarrollar un tumor.
- 45 12. La composición farmacéutica o de diagnóstico para ser usada según la reivindicación 11, en la que dicho tumor comprende carcinoma de mamas primario y/o metástasis.
- 50 13. Un estuche de ensayo para el diagnóstico de un tumor, comprendiendo dicho estuche de ensayo el anticuerpo o fragmento de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 ó 7, el polinucleótido de la reivindicación 3, el vector de la reivindicación 4 o la célula de la reivindicación 5, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.
- 55 14. Una molécula de unión a antígeno tumoral, que comprende un anticuerpo o fragmento de unión de la reivindicación 1 ó 2, para ser usado en la detección *in vivo* o la dirección a diana de un agente terapéutico y/o de diagnóstico para un tumor.

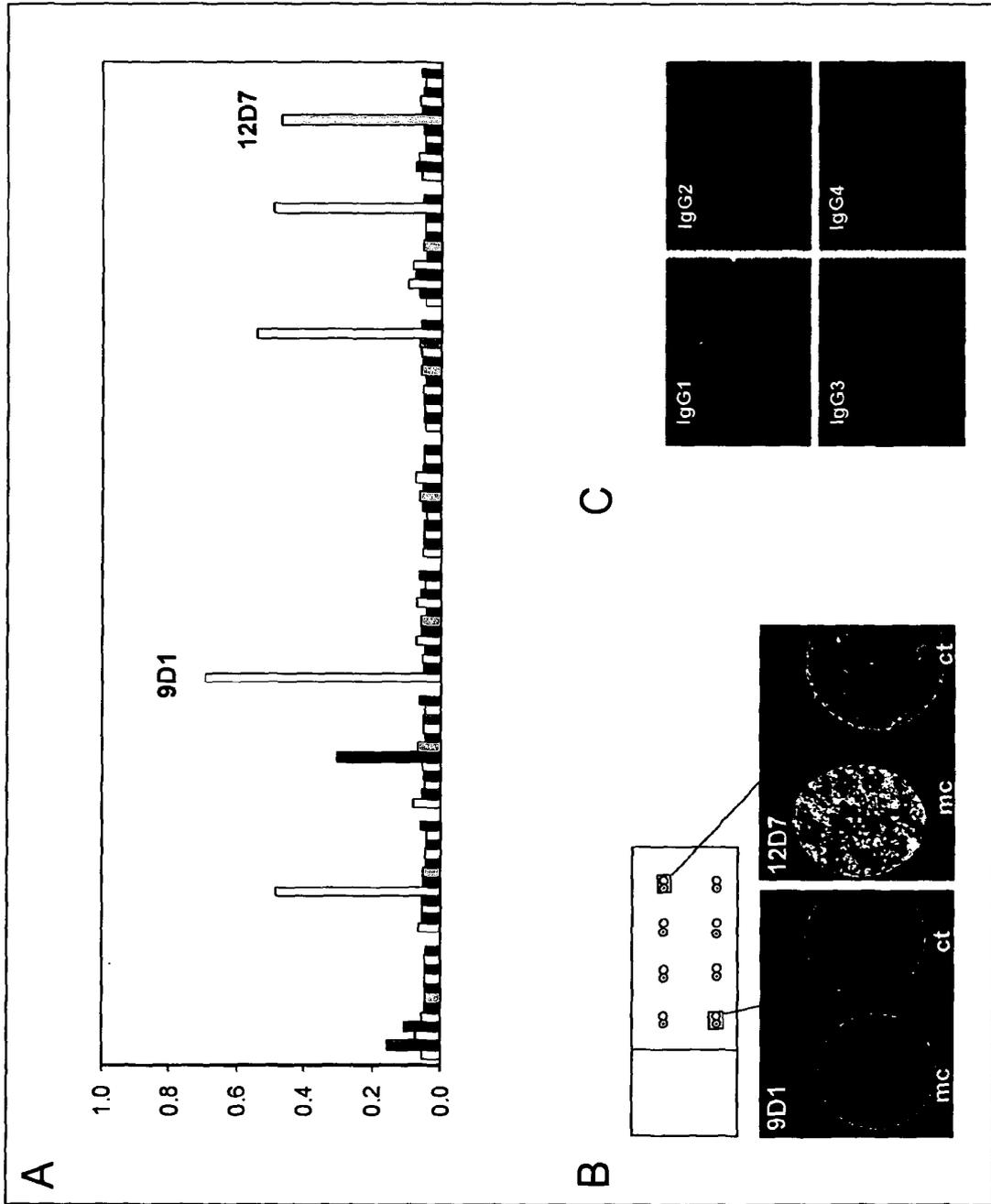
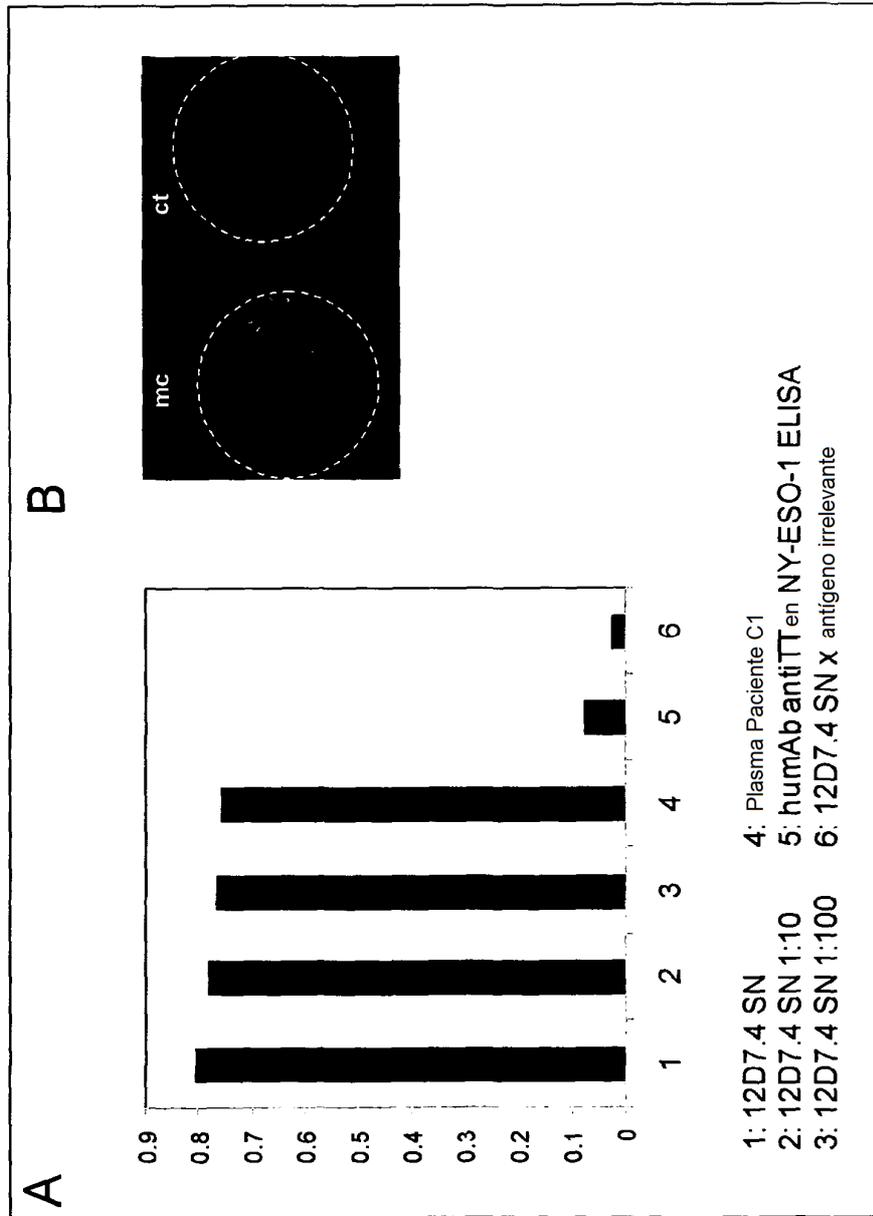


Fig. 1



**Fig. 2**

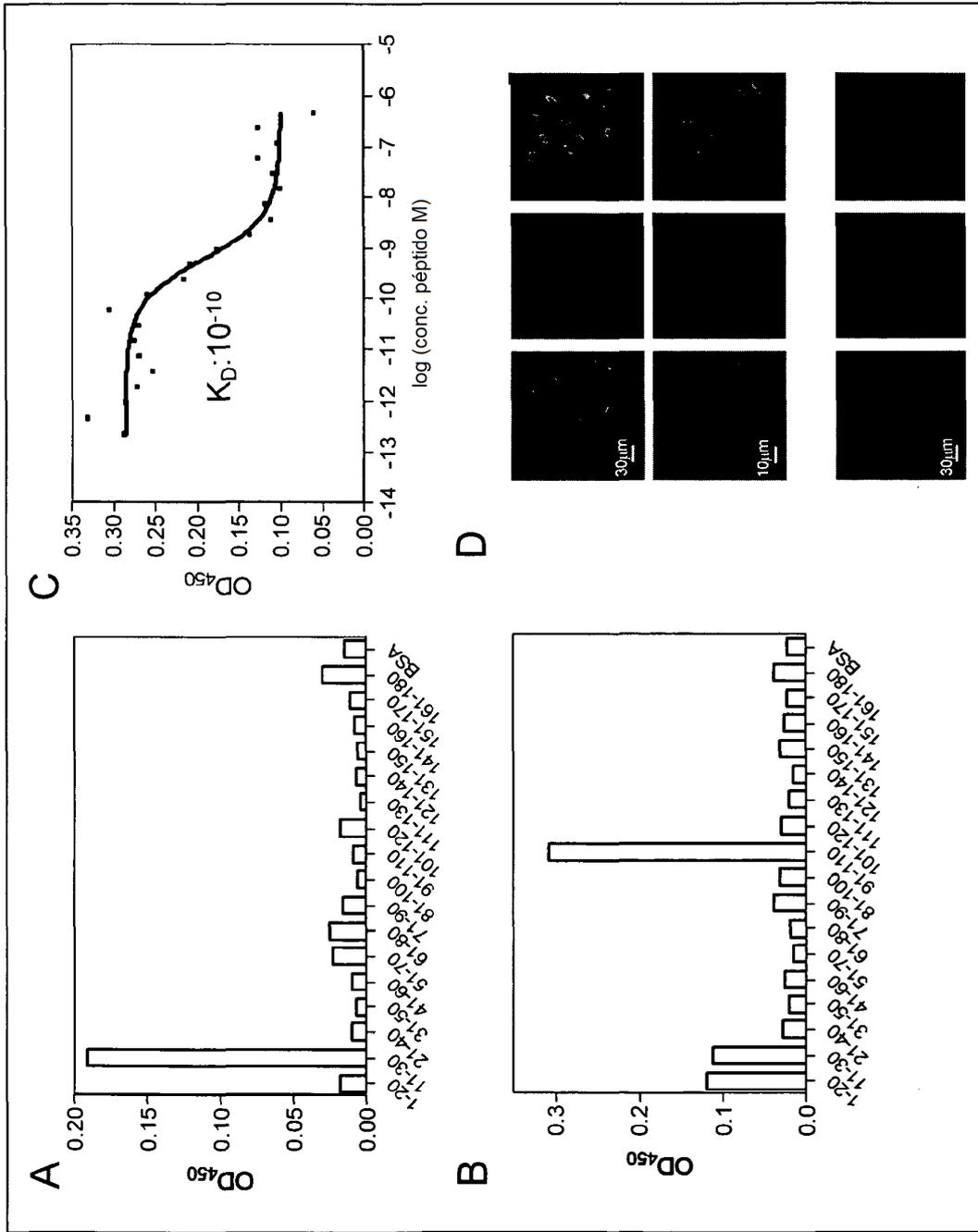


Fig. 3

ES 2 637 214 T3

12D7 cadena de VH

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----  
QVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFSFIDYGMSWVRQVPGKGLEWVAGMNWSGDKKG  
-----FR3-----CDR3-----JH-----  
HAESVKGRFIISRDNAKNTLYLEMSSLRVEDTALYFCARGEYSNRFDPRGRGTLVTVSS

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATTCAGCTTTATTGATTATGGCATGAGTTGGGTCCGCCAAGTTCAG  
GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCTGGCATGAATTGGAGCGGCATAAAAAAGGTCATGCGGAG  
TCTGTGAAGGGCCGATTCATCATTTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCCTGTATCTAGAAAT  
GAGCAGCCTAAGAGTCGAAGACACGGCCCTGTATTTTTGTGCGAGAGGGGAGTATAGCAATC  
GGTTCGACCCCCGGGGCCGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

12D7 cadena de VκL

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----  
DIVMTQTPLSLPVTLGQPASLSRSSQSLVFTDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSSR  
--FR3-----CDR3-----JK-----  
DPGVPDRFSGTGSGTDFTLEISRVEAEDIGVYYCMQTHWPPIFGQGTKVEIK

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCCT  
CTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATTCACTGATGGAAACACCTACTTGAATTGGTTTC  
AGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCACGGCGCCTAATTTATAAGGTCTCTTCTCGTGACCCTGGT  
GTCCCCGACAGATTCAGCGGCACTGGGTGAGGCACTGATTTACACTGGAAATCAGCAGGGT  
GGAGGCTGAGGATATTGGGGTTTACTACTGCATGCAAGGGACGCACTGGCCTCCGATTTTTG  
GCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Fig. 4