



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0808940-0 B1



(22) Data do Depósito: 13/03/2008

(45) Data de Concessão: 08/10/2019

(54) Título: ANTICORPO HUMANO-MURINO QUIMÉRICO OU XEGOGENEICO, HUMANIZADO, HUMANO OU SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO DE DIAGNÓSTICO, USO DO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, KIT PARA O DIAGNÓSTICO DE UM TUMOR E USO DA MOLÉCULA DE ANTÍGENO LIGANTE AO TUMOR

(51) Int.Cl.: C07K 16/00; C07K 16/30; A61K 39/395; A61P 35/00; G01N 33/53.

(30) Prioridade Unionista: 13/03/2007 EP 07 005 180.0.

(73) Titular(es): UNIVERSITÄT ZÜRICH (UNIVERSITY OF ZURICH).

(72) Inventor(es): CHRISTOPH ESSLINGER; SANDRA KUENZLE; IRENE ABELA; ALFRED ZIPPELIUS; DIRK JAEGER; ALEXANDER KNUTH; ROGER M. D. NITSCH; HOLGER MOCH; NORBERT GOEBELS.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008002021 de 13/03/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/110372 de 18/09/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/09/2009

(57) Resumo: ANTICORPO HUMANO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DO MESMO, ANTÍGENO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO OU CADEIA(S) DE IMUNOGLOBULINA DO MESMO, ANTICORPO, CADEIA DE IMUNOGLOBULINA OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DO MESMO, COMPOSIÇÃO, USOS DO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, DE UM ANTÍGENO, DE UM POLINUCLEOTÍDEO, DE UM VETOR, OU DE UMA CÉLULA, E DE UMA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO TUMORAL, MÉTODOS PARA TRATAR OU PREVENIR A PROGRESSÃO DE UM TUMOR EM UM INDIVÍDUO; PARA MELHORAR OS SINTOMAS ASSOCIADOS COM UM TUMOR; PARA DIAGNOSTICAR OU EXAMINAR UM INDIVÍDUO QUANTO À PRESENÇA DE UM TUMOR, OU PARA DETERMINAR O RISCO DO INDIVÍDUO DE DESENVOLVER UM TUMOR, PARA DIAGNOSTICAR E/OU TRATAR UM DISTÚRBO RELACIONADO A UM TUMOR, E PARA CLONAGEM MOLECULAR DE UM ANTICORPO, E, KIT PARA O DIAGNÓSTICO DE UM TUMOR São fornecidos novos anticorpos específicos do tumor humano, bem como seus fragmentos, derivados e variantes que reconhecem o antígeno NY-ES0-1 associado com o tumor. Além disso, as composições farmacêuticas contendo tais anticorpos e imitações destes no tratamento de tumores são descritas.

“ANTICORPO HUMANO-MURINO QUIMÉRICO OU XEGOGENEICO, HUMANIZADO, HUMANO OU SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO DE DIAGNÓSTICO, USO DO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, KIT PARA O DIAGNÓSTICO DE UM TUMOR E USO DA MOLÉCULA DE ANTÍGENO LIGANTE AO TUMOR”

Campo Da Invenção

A presente invenção diz respeito em geral a novas moléculas de ligação específicas de tumores, particularmente anticorpos humanos, bem como seus fragmentos, derivados e variantes que reconhecem antígenos tumorais e antígenos associados ao tumor, respectivamente. Além disso, a presente invenção diz respeito a composições farmacêuticas compreendendo tais moléculas de ligação, anticorpos e suas imitações no tratamento de vários tumores, em particular melanoma, câncer mamário e metástase.

Fundamentos Da Invenção

As respostas imunes humorais aos tumores ocorrem com uma frequência relativamente elevada em (1, 2). Este fenômeno foi explorado para

identificar uma variedade de antígenos associados a tumores (taa) pela triagem de bibliotecas de expressão autóloga com soro de pacientes de câncer (1). Vários destes taa agora servem como antígenos de células T para a indução de respostas antitumorais de CLT nos pacientes (3, 4). Esta preferência pela resposta imune celular, em muitos casos citotóxica, como estratégia terapêutica, está agora sendo reconsiderada e novas vacinas têm em mira também induzir respostas de anticorpos. Em parte, esta mudança de conceito pode ter sido influenciada pelo recente sucesso de vários anticorpos monoclonais para a terapia tumoral, tais como o trastuzumab (Herceptina) e bevacizumab (Avastina) (5). Embora estes anticorpos monoclonais tenham sido especificamente realçados contra os alvos de relevância oncológica presumida, os anticorpos que ocorrem em pacientes de câncer, ou espontaneamente ou após a vacinação, formam uma diferente classe de moléculas cuja significância terapêutica tem sido difícil de avaliar. Isto é na maioria das vezes devido à falta de abordagens experimentais diretas para seu isolamento e subsequente caracterização *in vitro* e em modelos de animais de câncer humano.

Assim, existe a necessidade de se superar as limitações acima descritas e prover um anticorpo terapêutico e diagnóstico contra antígenos envolvidos no câncer.

Sumário Da Invenção

A presente invenção faz uso da resposta imune específica do tumor de pacientes de câncer, para o isolamento do antígeno tumoral e dos anticorpos monoclonais humanos específicos do antígeno associado ao tumor (taa). Em particular, as experiências realizadas de acordo com a presente invenção foram bem sucedidas no isolamento de um anticorpo monoclonal específico para o taa NY-ESO-1 de um paciente de melanoma que apresentou um título sérico para NY-ESO-1 e uma resposta clínica parcial. Para isolar o anticorpo humano específico para um antígeno tumoral e taa,

respectivamente, a imunoistoquímica (IHC) com o uso de microarranjos teciduais (TMA) foi usada.

A presente invenção é assim direcionada a anticorpos humanos, fragmentos de ligação a antígeno e moléculas de ligação a antígenos similares, que são capazes de reconhecer o antígeno NY-ESO-1 associado ao tumor. Além disso, a presente invenção diz respeito a composições compreendendo referidos anticorpos e a métodos imunoterapêuticos e imunodiagnósticos usando-os.

Em uma forma de realização particularmente preferida da presente invenção, o anticorpo humano ou fragmento de ligação do mesmo a antígeno demonstram as características de ligação imunológica de um anticorpo caracterizado pelas regiões variáveis V_H e/ou V_L como apresentado na Figura 4 (SEQ ID NOs: 2 e 4). Alternativamente, o anticorpo é um anticorpo humanizado, xenogênico, ou um anticorpo quimérico humano-murino, este último sendo particularmente útil para métodos diagnósticos e estudos em animais. As composições terapêuticas que incluem os anticorpos ou seus fragmentos ativos, ou agonistas e moléculas cognatas, ou alternadamente, antagonistas destes, e métodos de uso de tais composições na prevenção, diagnóstico ou tratamento de um tumor, com o uso destas composições, acham-se também incluídas, em que uma quantidade eficaz da composição é administrada a um paciente em necessidade de tal tratamento.

O fragmento de ligação a antígeno do anticorpo pode ser um fragmento F_v de cadeia única, um fragmento $F(ab')$, um fragmento $F(ab)$, e um fragmento $F(ab')_2$, ou qualquer outro fragmento de ligação a antígeno. Em uma forma de realização específica, abaixo, o anticorpo ou seu fragmento é um anticorpo de isótipo IgG humano.

Naturalmente, a presente invenção se estende ao linfócito da memória humana B imortalizada e à célula B, respectivamente, que produz o anticorpo tendo as características distintas e únicas como definido abaixo.

A presente invenção também diz respeito a polinucleotídeos codificando pelo menos uma região variável de uma cadeia de imunoglobulina do anticorpo da invenção. Preferivelmente, referida região variável compreende pelo menos uma região determinante da complementaridade (CDR) de V_H e/ou V_L da região variável como apresentado na Figura 4 (SEQ ID NOs: 5 a 10).

Consequentemente, a presente invenção também inclui vetores compreendendo referidos polinucleotídeos e células hospedeiras com eles transformadas, bem como ao seu uso para a produção de um anticorpo e moléculas de ligação equivalentes que sejam específicas para os antígenos que são indicativos e/ou causativos quanto a um tumor, em particular quanto ao melanoma ou câncer de mamas.

O anticorpo, a(s) cadeia(s) de imunoglobulina, os seus fragmentos de ligação, e a ligação de antígeno ao referido anticorpo, podem ser usados nas composições farmacêuticas e diagnósticas para imunoterapia e diagnóstico tumorais, respectivamente. O uso das composições precedentes na preparação de um medicamento é, entretanto, preferido.

Consequentemente, é um objeto particular da presente invenção fornecer métodos para tratar ou prevenir uma doença cancerosa, tal como o carcinoma primário de mamas e as metástases. Os métodos compreendem administrar uma concentração eficaz de um anticorpo ou derivado de anticorpo ao paciente em que o anticorpo tem por objetivo o tecido e as células tumorais.

Outras formas de realização da presente invenção serão evidentes da descrição e dos Exemplos que seguem. Além disso, a descrição da presente invenção, quando necessário ou apropriado, pode ser suplementada com o conteúdo da exposição do pedido de patente Européia anterior do requerente EP 07 005 180.0 depositado no Escritório de Patentes Europeias em 13 de março de 2007.

Breve Descrição Dos Desenhos

Figura 1: O reservatório 12 D7 de cultura de células B da memória contém anticorpos específicos para NY-ESO-1. O meio condicionado pelas culturas das células B da memória foi ensaiado quanto à presença de anticorpos humanos específicos de NY-ESO-1 A) No ELISA apresentando NY-ESO-1 recombinante de comprimento completo. B) Na imunoistoquímica no carcinoma de mamas (mc) positivo em NY-ESO-1 e no tecido de controle (ct) negativo em NY-ESO-1. É mostrado o manchamento obtido com o meio condicionado de dois reservatórios de cultura de células B de memória positivo em ELISA (9D1, 12D7). C) O anticorpo específico de NY-ESO-1 contido no reservatório 12D7 é da subclasse do IgG1 como demonstrado pelo manchamento do tecido positivo em NY-ESO-1 com o meio condicionado de células B do reservatório de cultura 12D7 seguido por anticorpos secundários contra as subclasses IgG1-4 de IgG.

Figura 2: O clone número 4 do anticorpo 12D7 humano recombinante obtido por RT-PCR de células únicas das células B de memória cultivadas especificamente reconhece NY-ESO-1 em ELISA e nas seções dos tecidos. O fluido sobrenadante (SN) colhido das células 293T HEK transfectadas com vetores de imunoglobulina de cadeias pesada e leve expressando o clone 12D7 número quatro foi testado quanto à especificidade a NY-ESO-1 A) ELISA apresentando NY-ESO-1 de comprimento completo. Os valores do ELISA são indicados para SN não diluído (1:12D7,4 SN), uma diluição a 1/10 (2:12D7,4 SN) e uma diluição a 1/100 (3:12D7,4 SN). Para comparação, o sinal de ELISA, obtido com plasma do paciente do qual as culturas de células B de memória foram derivadas, usadas como uma diluição a 1/100, é também mostrado (4). Como controles, a ausência de ligação às placas de SN de ELISA revestidas com NY-ESO-1, obtidas após a transfecção de um anticorpo recombinante irrelevante produzido da mesma maneira como 12D7,4, é mostrada (5), bem como a ausência de ligação do

clone 12D7 nº 4 às placas de ELISA revestidas com o antígeno irrelevante. B) A imunistoquímica no carcinoma de mama (mc) positivo em NY-ESO-1 e no tecido de controle (ct) negativo em NY-ESO-1 apresenta ligação específica do clone 12D7 nº 4 ao carcinoma de mama.

Figura 3: Características do anticorpo monoclonal humano Manhattan. O mapeamento do epítipo foi realizado com o uso de peptídeos de sobreposição abrangendo a proteína NY-ESO-1 inteira aplicada sobre placas de ELISA. A) Manhattan especificamente se liga a um peptídeo abrangendo os aminoácidos 11 a 30 no término N da proteína NY-ESO-1. B) o soro do paciente C1 reconhece vários fragmentos peptídicos no término N e na região média de NY-ESO-1. C) As experiências de competição de ELISA com o peptídeo NY-ESO-1₁₁₋₃₀ determinam a avidez do Manhattan como $KD=10^{-10}$. D) O manchamento de imunofluorescência da linhagem celular SK-MEL-37 positiva em NY-ESO-1 com Manhattan humAb mostra a co-localização do manchamento do NY-ESO-1 com marcador nuclear Hoechst. O anticorpo de controle humano recombinante 8-15c5 específico para MOG não se liga.

Figura 4: Sequências amino e de nucleotídeos da região variável, isto é, cadeia pesada e cadeia leve capa do anticorpo 12D7. As regiões determinantes da complementaridade (CDRs) são sublinhadas.

Descrição Detalhada Da Invenção

A presente invenção diz respeito em geral a anticorpos e seus fragmentos de ligação a antígeno, que demonstram as características de ligação imunológica e/ou propriedades biológicas como delineado quanto ao anticorpo ilustrado nos Exemplos. Quando presente, a expressão “características de ligação imunológica”, ou outras características de ligação de um anticorpo com um antígeno, em todas de suas formas gramaticais, refere-se às características de especificidade, afinidade, reatividade cruzada, e outras características de ligação de um anticorpo. Naturalmente, a presente

invenção se estende ao anticorpo que também produz linhagens celulares e células recombinantes. A presente invenção ainda diz respeito a ensaios diagnósticos e a kits que compreendem a molécula de ligação da presente invenção, e a métodos terapêuticos com base neles.

5 De acordo com a presente invenção, um anticorpo humano específico para o antígeno NY-ESO-1 associado a tumor foi clonado de um paciente de melanoma que foi soropositivo quanto a NY-ESO-1 no ELISA e nas seções de tumores autólogos mediante o uso de um método para identificar, validar e produzir moléculas de ligação diagnóstica e
10 terapêuticamente úteis tumorais, essencialmente como apresentado no pedido internacional copendente do requerente PCT/EP2008/000053 “*Method of providing disease-specific binding molecules and targets*”, depositado em 7 de janeiro de 2008, cujo conteúdo de seu relatório fica aqui incorporado como referência. A triagem dos candidatos de anticorpos foi realizada em ELISA e
15 no tecido tumoral com o uso de uma adaptação da tecnologia de microarranjo tecidual. O anticorpo monoclonal humano obtido reativo ao tecido foi mostrado ligar-se ao término N de NY-ESO-1 que é também compartilhado pelo antígeno LAGE-1 associado ao tumor; ver o Exemplo 3.

A menos que de outra forma estabelecido, os termos “câncer”
20 e “tumor” são aqui usados intercambiavelmente.

A bem da clareza apenas, e sem restringir o escopo da presente invenção, a maioria das seguintes formas de realização são examinadas em relação aos anticorpos humanos e a moléculas semelhantes aos anticorpos que representam as moléculas de ligação preferidas para o desenvolvimento dos
25 agentes terapêuticos e diagnósticos de acordo com a presente invenção. Entretanto, deve ficar entendido que, como usado no contexto da presente invenção, o termo “anticorpo”, e seus fragmentos, podem também referir-se a outras moléculas de ligação não a anticorpos que se liguem a um antígeno NY-ESO-1 tumoral de origem humana (associado) incluindo, porém sem

limitar, hormônios, receptores, ligandos, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), auxiliares tais como as proteínas de choque ao calor (HSPs), bem como moléculas de aderência de célula-célula tais como os membros das superfamílias da caderina, integrina, lectina tipo C e imunoglobulina (Ig).

NY-ESO-1 tem sido originalmente identificado em um paciente de câncer esofágico com o uso de uma técnica de clonagem com base em anticorpo (SEREX, ver abaixo). Recentemente, pode-se observar que NY-ESO-1 pode representar o antígeno CT mais imunogênico, porque as respostas imunes celulares e humorais espontâneas podem ser observadas em um alto percentual de pacientes com tumores expressando NY-ESO-1 [Gnjatic *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003), 8862-8867; Jager e Knuth, *Breast* 14 (2005), 631-635).

Tendo em vista que os antígenos CT são seletivamente expressos nas células tumorais humanas e nas espermatogônias do testículo, eles representam um grupo promissor dos antígenos alvo para uma abordagem imunoterapêutica em pacientes de câncer. Entre eles, NY-ESO-1 parece ser fortemente imunogênico e é conhecido para induzir uma resposta imune humoral e celular eficiente em pacientes com melanoma e câncer ovariano, mamário, pulmonar, bem como da bexiga, tornando-o um alvo ideal para a imunoterapia ativa do câncer. Para informação sobre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos, bem como origem, literatura principal, etc., dos antígenos primários e antígenos associados a tumor, ver bancos de dados apropriados tais como o UniProtKB/Swiss-Prot depositados por EMBL, no qual uma entrada para NY-ESO-1 pode ser encontrada sob o número de acesso primário P78358.

Em uma forma de realização particularmente preferida, o anticorpo da presente invenção se liga a um epítopo definido por uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 11 representando os

resíduos de aminoácidos 11 a 30 da proteína NY-ESO-1.

Meios e métodos para a produção recombinante de anticorpos e misturas destes, bem como métodos de triagem quanto à molécula de ligação de competição, que podem ou não se anticorpos, são conhecidos na técnica; ver também os Exemplos. Entretanto, como descrito neste relatório, em particular com respeito a aplicações terapêuticas em seres humanos, o anticorpo da presente invenção é um anticorpo humano no sentido de que a aplicação do referido anticorpo seja substancialmente livre de uma resposta de anticorpo humano antimurino (HAMA) de outra forma observada quanto aos anticorpos quiméricos e mesmo humanizados.

Além disso, como demonstrado no Exemplo 3 anexo, foi identificado e clonado um anticorpo que apresenta afinidade de ligação particularmente elevada com uma constante de dissociação (K_D) de equilíbrio da interação com seu antígeno cognato na faixa nanomolar inferior. Preferivelmente, a afinidade de ligação da molécula de ligação da presente invenção com seu antígeno cognato é de cerca de pelo menos 10^{-7} M, mais preferível de pelo menos 10^{-8} M, particularmente preferida de 10^{-9} M, e ainda mais preferível de pelo menos 10^{-10} M.

A presente invenção exemplifica o anticorpo anti-NY-ESO-1 humano e seus fragmentos de ligação, que podem ser caracterizados por compreender em sua região variável, isto é, domínio de ligação, pelo menos uma região determinante da complementaridade (CDR) do V_H e/ou V_L da região variável compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na Figura 4 da (V_H) (SEQ ID NO: 2) e (V_L) (SEQ ID NO: 4). Um conjunto exemplar de CDRs das sequências de aminoácidos acima das regiões V_H e/ou B_L como expresso na Figura 4, é dado nas SEQ ID NOs: 5 a 10. Entretanto, como examinado no seguinte, a pessoa versada na técnica é bem ciente do fato de que, além disso, ou alternativamente, as CDRs podem ser usadas, o que difere em sua sequência de aminoácidos daquelas apresentadas nas SEQ

ID NOs: 5 a 10 por um, dois, três ou mesmo mais aminoácidos no caso de CDR2 e CDR3.

Em uma forma de realização, o anticorpo da presente invenção é qualquer um de um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácidos das regiões V_H e/ou V_L , como apresentado na Figura 4. Alternativamente, o anticorpo da presente invenção é um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo a antígeno, que compete para a ligação ao antígeno de NY-ESO-1 com pelo menos um dos anticorpos tendo a região V_H e/ou a V_L , como apresentado na Figura 4. Esses anticorpos podem ser murinos também, entretanto anticorpos humanos-murinos humanizados, xenogênicos ou quiméricos sendo preferidos, em particular para aplicações terapêuticas. Um fragmento de ligação a antígeno do anticorpo pode ser, por exemplo, um fragmento Fv de cadeia única (scFv), um fragmento F(ab'), um fragmento F(ab), ou um fragmento F(ab')₂.

Assim, para algumas aplicações, apenas as regiões variáveis dos anticorpos são requeridas, as quais podem ser obtidas pelo tratamento do anticorpo com reagentes adequados de modo a gerar as porções Fab', Fab ou F(ab'')₂. Tais fragmentos são suficientes para uso, por exemplo, em procedimentos imunodiagnósticos envolvendo acoplamento das porções imuno específicas das imunoglobulinas, para detectar reagentes tais como os radioisótopos.

Como uma alternativa para se obter imunoglobulinas diretamente da cultura de células B imobilizadas ou células de memória B, as células imortalizadas podem ser usadas como uma fonte de locais redistribuídos de cadeia pesada e cadeia leve para subsequente expressão e/ou manipulação genética. Os genes de anticorpos redistribuídos podem ser de transcrição reversa dos mRNAs apropriados para produzir cDNA. Se desejável, a região constante de cadeia pesada pode ser trocada por aquela de um diferente isótipo ou completamente eliminada. As regiões variáveis podem ser ligadas

para codificar regiões Fv de cadeia única. As regiões Fv múltiplas podem ser ligadas para conferir a capacidade de ligação a mais do que um alvo, ou combinações de cadeias quiméricas pesadas e leves podem ser empregadas. Uma vez o material genético esteja disponível, o esquema dos análogos como descrito acima, que retêm sua capacidade de se ligarem ao alvo desejado, é direto. Métodos para clonagem de regiões variáveis de anticorpos e geração de anticorpos recombinantes, são conhecidos da pessoa habilitada na técnica, e são descritos, por exemplo, em Gilliland *et al.*, *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke *et al.*, *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

Uma vez o material genético apropriado seja obtido e, se desejável, modificado para codificar um análogo, as sequências codificadoras, incluindo aquelas que codificam, no mínimo, as regiões variáveis de cadeia pesada e leve, podem ser introduzidas nos sistemas de expressão contidos nos vetores que podem ser transfectados nas células hospedeiras recombinantes padrão. Uma variedade de tais células hospedeiras pode ser usada; para o processamento eficiente, entretanto, células de mamíferos são preferidas. Linhagens celulares de mamíferos típicas úteis para esta finalidade, incluem as células CHO, as células HEK 293, ou as células NSO. A produção do anticorpo ou análogo é então empreendida pelo cultivo do hospedeiro recombinante modificado sob condições de cultura apropriada para o crescimento das células hospedeiras e a expressão das sequências codificadoras. Os anticorpos são então recuperados pelo seu isolamento da cultura. Os sistemas de expressão são preferivelmente planejados para incluir peptídeos de sinal de modo que os anticorpos resultantes sejam secretados no meio; entretanto, a produção intracelular é também possível.

Em outra forma de realização, a presente invenção diz respeito ao antígeno NY-ESO-1, que é reconhecido pelo anticorpo da presente invenção anteriormente aqui descrito, tanto na forma de peptídeo quanto na forma pós-translacional modificada, em que o antígeno é preferivelmente um

peptídeo consistindo de pelo menos 6 a 50 e, preferivelmente, não mais do que 10 a 100 aminoácidos de comprimento, o qual contém o epítopo cognato. Mais preferivelmente o antígeno da presente invenção compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, e consiste de cerca de 10 a 30 aminoácidos, e preferivelmente tem não mais do que cerca de 20 aminoácidos de comprimento. A molécula é grande o bastante para ser antigênica sem qualquer modificação pós-translacional, e em consequência é útil como um imunógeno, quando combinada com um adjuvante (ou sem ele), tanto nas formas precursora quanto pós-translacionalmente modificada. Estes antígenos e peptídeos podem ser usados para determinar se, ou não, os anticorpos se acham presentes em uma amostra, tal como de soro ou de sangue. Preferivelmente, o antígeno da presente invenção é capaz de eliciar uma resposta humoral no ser humano.

De acordo com o acima, a presente invenção também diz respeito a um polinucleotídeo codificando o antígeno ou molécula de ligação da presente invenção, no caso do anticorpo preferivelmente pelo menos uma região variável de uma cadeia de imunoglobulina do anticorpo descrito acima. Tipicamente, referida região variável codificada pelo polinucleotídeo compreende pelo menos uma região determinante da complementaridade (CDR) de V_H e/ou V_L da região variável do referido anticorpo. A pessoa versada na técnica sabe que cada domínio variável (a cadeia pesada V_H e a cadeia leve V_L) de um anticorpo compreende três regiões hipervariáveis, algumas vezes denominadas regiões determinantes da complementaridade ou “CDRs” flanqueadas por quatro regiões de estrutura ou “FRs” relativamente conservadas e referem-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação a antígeno. As regiões hipervariáveis ou CDRs do subtipo IgG humano de anticorpo compreende resíduos de aminoácidos dos resíduos 24 ao 34 (L1), 50 a 56 (L2) e 89 a 97 (L3) no domínio variável de cadeia leve, e 31 a 35 (H1), 50 a 65 (H2) e 95 a 102 (H3) no domínio

variável de cadeia pesada, como descrito por Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edição, Serviço de Saúde Pública, Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, Md (1991) e/ou aqueles resíduos de um circuito hipervariável, isto é, os resíduos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) e 91 a 96 (L3) no domínio variável de cadeia leve, e 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) e 96 a 101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada, como descrito por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917. A estrutura ou os resíduos da FR são aqueles resíduos do domínio variável diferentes e suportando as regiões hipervariáveis. A expressão “ligação específica” refere-se à ligação de anticorpos a um antígeno predeterminado. Tipicamente, o anticorpo se liga com uma constante de dissociação K_D de 10^{-7} M ou menos, e se liga ao antígeno predeterminado com um K_D que é pelo menos duas vezes menor do que sua K_D para ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína, ou qualquer outro polipeptídeo especificado) outro que não o antígeno predeterminado. As expressões “um anticorpo reconhecendo um antígeno” e “um anticorpo específico para um antígeno” são usadas intercambiavelmente neste relatório com a expressão “um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno”. Como aqui usado, ligação “altamente específica” significa que a K_D relativa do anticorpo para o epítipo alvo específico, isto é, taa NY-ESO-1 é pelo menos 10 vezes menor do que a K_D para ligar aquele anticorpo a outros ligandos. Preferivelmente, o anticorpo liga seu antígeno de NY-ESO-1 cognato com uma constante de dissociação (K_D) de 10^{-9} M ou menos.

A afinidade ou avidez de um anticorpo quanto a um antígeno pode ser determinada experimentalmente com o uso de qualquer método adequado; ver, por exemplo, Berzofsky *et al.*, “*Antibody-Antigen Interactions*” em *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, NY (1984), Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company, New York, NY (1992), e métodos aqui descritos. A afinidade

medida de uma interação particular de anticorpo-antígeno pode variar se medida sob diferentes condições, por exemplo a concentração de sal, o pH. Assim, as medições da afinidade e de outros parâmetros de antígeno-ligação, por exemplo, K sub D, IC50, são preferivelmente realizadas com soluções padronizadas de anticorpo e antígeno, e um tampão padronizado.

A pessoa habilitada na técnica observará facilmente que o domínio variável do anticorpo tendo o domínio variável acima descrito pode ser usado para a construção de outros polipeptídeos ou anticorpos de especificidade e função biológica desejadas. Assim sendo, a presente invenção também inclui polipeptídeos e anticorpos que compreendam pelo menos uma CDR do domínio variável acima descrito e que vantajosamente tenha substancialmente as mesmas ou similares propriedades de ligação como o anticorpo descrito nos exemplos anexos. A pessoa habilitada na técnica observará facilmente que o uso dos anticorpos aqui descritos de domínios variáveis ou das CDRs podem ser construídos de acordo com métodos conhecidos na técnica, por exemplo conforme descrito nos pedidos de patentes europeias EP 0 451 216 A1 e EP 0 549 581 A1. Além disso, a pessoa habilitada na técnica sabe que a afinidade de ligação pode ser intensificada pela produção das substituições de aminoácidos dentro das CDRs ou dentro dos circuitos hipervariáveis (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917) que se sobrepõem parcialmente às CDRs como definido por Kabat. Assim, a presente invenção também diz respeito a anticorpos em que uma ou mais das CDRs mencionadas compreendam uma ou mais, preferivelmente não mais do que duas substituições de aminoácidos. Preferivelmente, o anticorpo da invenção compreende, em uma ou em ambas as suas cadeias de imunoglobulina, duas ou todas as três CDRs das regiões variáveis como apresentado nas SEQ ID NOs: 5 a 10.

O polinucleotídeo da invenção codificando o anticorpo acima descrito pode ser, por exemplo, DNA, cDNA, RNA ou DNA ou RNA

sinteticamente produzido ou uma molécula de ácido nucleico quimérica recombinantemente produzida compreendendo qualquer daqueles polinucleotídeos, ou sozinho ou em combinação. Preferivelmente, referido polinucleotídeo é parte de um vetor. Tais vetores podem compreender ainda genes tais como os genes marcadores que levem em conta a seleção do referido vetor em uma célula hospedeira adequada e sob condições adequadas.

Preferivelmente, o polinucleotídeo da invenção é operativamente ligado às sequências de controle da expressão possibilitando a expressão nas células procarióticas ou eucarióticas. A expressão do referido polinucleotídeo compreende a transcrição do polinucleotídeo em um mRNA traduzível. Os elementos reguladores que garantem a expressão nas células eucarióticas, preferivelmente células de mamíferos, são bem conhecidos daqueles habilitados na técnica. Eles usualmente compreendem sequências reguladoras que asseguram o início da transcrição e, opcionalmente, sinais poli-A assegurando o término da transcrição e a estabilização do transcrito. Elementos reguladores adicionais podem incluir intensificadores transcricionais, bem como translacionais, e/ou regiões promotoras naturalmente associadas ou heterólogas.

A este respeito, a pessoa habilitada na técnica observará facilmente que os polinucleotídeos codificando pelo menos o domínio variável da cadeia leve e/ou pesada, podem codificar os domínios variáveis de ambas as cadeias de imunoglobulina ou apenas uma. Da mesma forma, referidos polinucleotídeos podem estar sob o controle do mesmo promotor ou podem ser separadamente controlados para expressão. Elementos reguladores possíveis que permitam a expressão nas células hospedeiras procarióticas compreendem, por exemplo, os promotores P_L , lac, trp ou tac em *E. coli*, e exemplos de elementos reguladores que permitam a expressão nas células hospedeiras eucarióticas são os promotores AOX1 ou GAL1 na levedura, ou

os promotores CMV, SV40, RSV, o intensificador SV40, ou um íntron da globina nas células de mamíferos e de outros animais.

Além dos elementos que são responsáveis pela iniciação da transcrição, tais elementos reguladores podem também compreender sinais de terminação da transcrição, tais como o sítio SV40-poli-A, ou o sítio tk-poli-A, a jusante do polinucleotídeo. Além disso, dependendo do sistema de expressão, as sequências condutoras usadas capazes de dirigir o polipeptídeo para um compartimento celular ou secretá-lo no meio, podem ser adicionadas à sequência codificadora do polinucleotídeo da invenção, e são bem conhecidas na técnica. A(s) sequência(s) condutora(s) é(são) montada(s) na fase apropriada com sequências de translação, iniciação e terminação e, preferivelmente, uma sequência condutora capaz de dirigir a secreção da proteína transladada, ou uma sua porção, dentro do espaço periplasmático ou do meio extracelular. Opcionalmente, a sequência heteróloga pode codificar uma proteína de fusão incluindo um peptídeo de identificação C- ou N-terminal comunicando características desejadas, por exemplo, estabilização ou purificação simplificada do produto recombinante expresso. Neste contexto, vetores de expressão adequados são conhecidos na técnica, tais como o vetor de expressão pcDV1 de cDNA Okayama-Berg (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) ou pSPORT1 (GIBCO BRL).

Preferivelmente, as sequências de controle da expressão serão sistemas promotores eucarióticos em vetores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas, porém podem ser usadas sequências de controle para hospedeiros eucarióticos. Uma vez o vetor tenha sido incorporado no hospedeiro apropriado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para expressão de alto nível das sequências de nucleotídeos, e, conforme desejado, a condição e purificação das cadeias de imunoglobulina leves, cadeias pesadas, dímeros de cadeia leve/pesada ou

anticorpos intactos, fragmentos de ligação ou outras formas de imunoglobulina, podem resultar; ver Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979).

Além disso, a presente invenção diz respeito a vetores, particularmente plasmídeos, cosmídeos, vírus e bacteriófagos usados convencionalmente na engenharia genética, que compreendem um polinucleotídeo codificando o antígeno ou, preferivelmente, um domínio variável de uma cadeia de imunoglobulina de um anticorpo da invenção; opcionalmente em combinação com um polinucleotídeo da invenção que codifique o domínio variável da outra cadeia de imunoglobulina do anticorpo da invenção. Preferivelmente, referido vetor é um vetor de expressão e/ou um vetor de transferência ou alvejamento de genes. Os vetores de expressão derivados de vírus tais como os retrovírus, o vírus de vacínia, vírus adenoassociados, herpes vírus, ou vírus de papiloma bovino, podem ser usados para liberação dos polinucleotídeos ou vetor da invenção dentro da população de células alvejadas. Métodos que são bem conhecidos daqueles habilitados na técnica podem ser usados para construir vetores virais recombinantes; ver, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. e em Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates e Wiley Interscience, N.Y. (1994). Alternativamente, os polinucleotídeos e vetores da invenção podem ser reconstituídos nos lipossomas para liberação às células alvo. Os vetores contendo os polinucleotídeos da invenção [por exemplo, o(s) domínio(s) variável(is) pesado(s) e/ou leve(s) das sequências codificadoras de cadeias de imunoglobulina e sequências de controle da expressão] podem ser transferidos para a célula hospedeira mediante métodos bem conhecidos, que variam dependendo do tipo de hospedeiro celular. Por exemplo, a transfecção de cloreto de cálcio é comumente utilizada para células procarióticas,

enquanto o tratamento de fosfato de cálcio ou eletroporação pode ser usado para outros hospedeiros celulares; ver Sambrook, acima.

A presente invenção além disso diz respeito a células hospedeiras transformadas com um polinucleotídeo ou vetor da invenção.

- 5 Referida célula hospedeira pode ser uma célula procariótica ou eucariótica. O polinucleotídeo ou vetor da invenção, que se acha presente na célula hospedeira, pode ou ser integrado no genoma da célula hospedeira ou pode ser mantido extracromossomicamente. A célula hospedeira pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica, tal como uma célula bacteriana, de inseto, 10 fúngica, de planta, de animal ou humana. Células fúngicas preferidas são, por exemplo, aquelas do gênero *Saccharomyces*, em particular aquelas da espécie *S. cerevisiae*. O termo “procariótico” denota incluir todas as bactérias que possam ser transformadas ou transfectadas com um DNA ou moléculas de RNA para a expressão de um anticorpo da invenção ou as cadeias de 15 imunoglobulina correspondentes. Os hospedeiros procarióticos podem incluir bactérias Gram-negativas, bem como Gram-positivas tais como, por exemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis*. O termo “eucariótico” denota a inclusão de células de levedura, de planta superior, de inseto e preferivelmente de mamíferos, mais preferivelmente sendo as células 20 HEK 293, NSO e CHO. Dependendo do hospedeiro empregado em um procedimento de produção recombinante, os anticorpos ou as cadeias de imunoglobulina codificadas pelo polinucleotídeo da presente invenção podem ser glicosiladas ou podem ser não glicosiladas. Os anticorpos da invenção ou as cadeias de imunoglobulina correspondentes podem também incluir um 25 resíduo de aminoácido de metionina inicial. Um polinucleotídeo da invenção pode ser usado para transformar ou transfectar o hospedeiro com o uso de qualquer das técnicas comumente conhecidas daqueles de experiência normal na técnica. Além disso, métodos para preparar genes fundidos, operavelmente ligados e expressando-os, por exemplo, em células de mamíferos e em

bactérias, são bem conhecidos na técnica (Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989). As construções genéticas e os métodos nelas descritos podem ser utilizados para expressão do anticorpo da invenção ou as cadeias de imunoglobulina correspondentes nos hospedeiros eucarióticos ou procarióticos. Em geral, os vetores de expressão contendo sequências promotoras que facilitem a transcrição eficiente do polinucleotídeo introduzido, são usados em conexão com o hospedeiro. O vetor de expressão tipicamente contém uma origem de replicação, um promotor e um terminador, bem como genes específicos que sejam capazes de prover a seleção fenotípica das células transformadas. Células fonte adequadas para as sequências de DNA e células hospedeiras para expressão e secreção da imunoglobulina, podem ser obtidas de várias fontes, tais como a American Type Culture Collection [*"Catalogue of Cell Lines and Hybridomas"* Quinta edição (1985) Rockville, Maryland, U.S.A., que fica aqui incorporada como referência]. Além disso, os animais transgênicos, preferivelmente mamíferos, compreendendo células da invenção, podem ser usados para a produção em larga escala do anticorpo da invenção.

Assim sendo, em uma outra forma de realização, a presente invenção diz respeito a um método para a produção de um antígeno da presente invenção ou de um anticorpo ou de um fragmento de ligação ou de sua(s) cadeia(s) de imunoglobulina, referido método compreendendo:

- (a) cultivar uma célula como descrito acima; e
- (b) isolar referido antígeno, anticorpo ou fragmento de ligação, ou sua(s) cadeia(s) de imunoglobulina, da cultura.

Os hospedeiros transformados podem ser desenvolvidos em fermentadores e cultivados de acordo com técnica conhecidas na prática para se obter crescimento celular ótimo. Uma vez expressos, os anticorpos completos, seus dímeros, cadeias individuais leves e pesadas, ou outras

formas de imunoglobulina da presente invenção, podem ser purificados de acordo com procedimentos padrão da técnica, incluindo a precipitação do sulfato de amônio, as colunas de afinidade, a cromatografia de coluna, a eletroforese em gel e outros; ver Scopes, "*Protein Purification*", Springer Verlag, N.Y. (1982). O anticorpo ou sua(s) cadeia(s) de imunoglobulina correspondente(s) da invenção pode(m), então, ser isolados do meio de crescimento, dos lisados celulares, ou das frações da membrana celular. O isolamento e a purificação, por exemplo, dos anticorpos ou cadeias de imunoglobulinas recombinantemente expressos da invenção podem ser feitos por qualquer meio convencional, tal como, por exemplo, as separações cromatográficas preparativas e as separações imunológicas tais como aqueles envolvendo o uso de anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos, por exemplo, contra a região constante do anticorpo da invenção. Será evidente àqueles versados na técnica, que os anticorpos da invenção podem ser ainda acoplados a outros componentes para, por exemplo, aplicações de alvejamento de medicamentos e formação de imagem. Tal acoplamento pode ser conduzido quimicamente após a expressão do anticorpo ou antígeno ao sítio de ligação, ou o produto de acoplamento pode ser engendrado dentro do anticorpo ou antígeno da invenção no nível do DNA. Os DNAs são então expressos em um sistema de hospedeiro adequado, e as proteínas expressas são coletadas e renaturalizadas, se necessário.

Imunoglobulinas substancialmente puras de pelo menos cerca de 90 a 95 % de homogeneidade são preferidas, e de 98 a 99 % ou mais de homogeneidade são as mais preferidas, para usos farmacêuticos. Uma vez purificados, parcialmente ou até a homogeneidade, conforme desejável, os anticorpos podem então ser usados terapeuticamente (inclusive extracorporeamente) ou nos procedimentos de desenvolvimento e ensaios de desempenho.

A presente invenção também envolve um método para

produzir células capazes de expressar um anticorpo da invenção ou sua(s) cadeia(s) de imunoglobulina correspondente(s) compreendendo células geneticamente engendradas com o polinucleotídeo ou com o vetor da invenção. As células obteníveis pelo método da invenção podem ser usadas, por exemplo, para testar a interação do anticorpo da invenção com seu antígeno.

Como mencionado anteriormente, a imunoglobulina ou seus cDNAs codificadores podem ser ainda modificados. Assim, em uma outra forma de realização, o método da presente invenção compreende qualquer uma das etapas de produzir um anticorpo quimérico, anticorpo humanizado, anticorpo de cadeia única, fragmento Fab, anticorpo biespecífico, anticorpo de fusão, anticorpo rotulado ou um análogo de qualquer um destes. Métodos correspondentes são conhecidos da pessoa habilitada na técnica, e são descritos, por exemplo, em Harlow e Lane “*Antibodies, A Laboratory Manual*”, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Quando os derivados dos referidos anticorpos são obtidos pela técnica de apresentação de fago, a ressonância de plásmon superficial como empregada no sistema BIAcore pode ser usada para aumentar a eficiência dos anticorpos de fago que se ligam ao mesmo epítipo como aquele de qualquer um dos anticorpos aqui descritos [Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13]. A produção dos anticorpos quiméricos é descrita, por exemplo, no pedido internacional WO 89/09622. Métodos para a produção de anticorpos humanizados são descritos, por exemplo, no pedido europeu EP-A1 0 239 400 e no pedido internacional WO 90/07861. Outras fontes de anticorpos a serem utilizados de acordo com a presente invenção são os anticorpos assim chamados xenogênicos. O princípio geral para a produção dos anticorpos xenogênicos, tais como os anticorpos humanos em camundongos é descrito, por exemplo, nos pedidos internacionais WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 e WO 96/33735. Como examinado

acima, o anticorpo da invenção pode existir em uma variedade de formas além dos anticorpos completos, incluindo, por exemplo, Fv, Fab e F(ab)₂, bem como nas cadeias únicas. Ver, por exemplo, o pedido internacional WO 88/09344.

5 Os anticorpos da presente invenção, ou sua(s) cadeia(s) de imunoglobulina correspondente(s) podem ser ainda modificados com o uso de técnicas convencionais conhecidas na prática, por exemplo, pelo uso de deleção(ões), inserção(ões), substituição(ões), adição(ões) e/ou recombinação(ões), e/ou de qual(is)quer outra(s) modificação(ões) conhecida(s) na técnica, ou sozinhas ou em combinação. Métodos para
10 introduzir tais modificações na sequência de DNA subjacente à sequência de aminoácidos de uma cadeia de imunoglobulina são bem conhecidos da pessoa habilitada na técnica; ver, por exemplo, Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. e Ausubel,
15 *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates e Wiley Interscience, N.Y. (1994). As modificações do anticorpo da invenção incluem as derivações químicas e/ou enzimáticas em um ou mais aminoácidos constituintes, incluindo as modificações de cadeia lateral, as modificações da estrutura, e as modificações N- e C-terminais incluindo acetilação,
20 hidroxilação, metilação, amidação, e a ligação de carboidrato ou componentes lipídicos, cofatores, e outros. Da mesma forma, a presente invenção inclui a produção de proteínas quiméricas que compreendam o anticorpo descrito ou algum de seus fragmentos no término amino fundido à molécula heteróloga, como um ligando imunoestimulador no término carboxila; ver, por exemplo,
25 o pedido internacional WO 00/30680 para detalhes técnicos correspondentes.

Adicionalmente, a presente invenção inclui pequenos peptídeos que incluem aqueles contendo uma molécula de ligação como descrito acima, por exemplo contendo a região CDR3 da região variável de qualquer um dos anticorpos mencionados, em particular a CDR3 da cadeia

pesada, tendo em vista ter sido observado frequentemente que a CDR3 de cadeia pesada (HCDR3) é a região que tem um grau mais elevado de variabilidade e uma participação predominante na interação de antígeno-anticorpo. Tais peptídeos podem facilmente ser sintetizados ou produzidos por meios recombinantes para produzir um agente de ligação útil de acordo com a invenção. Tais métodos são bem conhecidos daqueles de experiência normal na técnica. Os peptídeos podem ser sintetizados, por exemplo, com o uso de sintetizadores peptídicos automáticos, os quais se acham comercialmente disponíveis. Os peptídeos podem ser produzidos por técnicas recombinantes mediante a incorporação do DNA expressando o peptídeo em um vetor de expressão e transformando-se as células com o vetor de expressão para produzir o peptídeo.

Consequentemente, a presente invenção diz respeito a qualquer molécula de ligação, anticorpo ou fragmento de ligação, que são obteníveis de acordo com os meios acima descritos e que apresentam as mencionadas propriedades, isto é, que especificamente reconhecem NY-ESO-1, e que, para uso terapêutico, preferivelmente mantêm substancialmente uma estrutura humana de modo a que seja destituído da imunogenicidade em um paciente.

Em uma outra forma de realização da presente invenção, o anticorpo, a cadeia de imunoglobulina ou um fragmento de ligação do mesmo ou o antígeno, são detectavelmente rotulados. Os agentes de rotulagem podem ser acoplados ou direta ou indiretamente aos anticorpos ou antígenos da invenção. Um exemplo de acoplamento indireto é pelo uso de um componente espaçador. Além disso, os anticorpos da presente invenção podem compreender um outro domínio, referido domínio sendo ligado por ligações covalentes ou não covalentes. A articulação pode basear-se na fusão genética de acordo com os métodos conhecidos na técnica e descritos acima, ou pode ser realizada, por exemplo, por articulação química como descrito, por

exemplo, no pedido internacional WO 94/04686. O domínio adicional presente na proteína de fusão compreendendo o anticorpo da invenção pode preferivelmente ser ligado por um ligador flexível, vantajosamente um ligador de polipeptídeo, em que o referido ligador de polipeptídeo compreende uma pluralidade de aminoácidos hidrofílicos, ligados a peptídeos, de um comprimento suficiente para abranger a distância entre a extremidade C-terminal do referido outro domínio e a extremidade N-terminal do anticorpo da invenção, ou vice-versa. O agente terapêutica ou diagnosticamente ativo pode ser acoplado ao anticorpo da invenção ou a um fragmento de ligação do mesmo a antígeno por vários meios. Isto inclui, por exemplo, as proteínas de fusão de cadeia única compreendendo as regiões variáveis do anticorpo da invenção acoplado por métodos covalentes, tais como as articulações peptídicas, ao agente terapêutica ou diagnosticamente ativo. Outros exemplos incluem moléculas que compreendem pelo menos um fragmento de ligação a antígeno acoplado às moléculas adicionais, covalentemente ou não covalentemente incluem aquelas na seguinte lista ilustrativa não limitativa. Traunecker, *Int. J. Cancer Surp. SuDP* 7 (1992), 51-52, descreve o reagente biespecífico janusin em que a região Fv direcionada a CD3 é acoplada a CD4 solúvel ou a outros ligandos tais como OVCA e IL-7. De forma semelhante, as regiões variáveis do anticorpo da invenção podem ser construídas em moléculas Fv e acopladas a ligandos alternativos tais como aqueles ilustrados no citado artigo. Higgins, *J. Infect Disease* 166 (1992), 198-202, descreveu um anticorpo heteroconjugado composto de OKT3 de ligação cruzada a um anticorpo dirigido a uma sequência específica na região V3 de GP120. Tais anticorpos heteroconjugados podem também ser construídos com o uso pelo menos das regiões variáveis contidas no anticorpo dos métodos da invenção. Exemplos adicionais de anticorpos específicos incluem aqueles descritos por Fanger, *Cancer Treat. Res.* 68 (1993), 181-194 e por Fanger, *Crit. Rev. Immunol.* 12 (1992), 101-124. Os conjugados que são imunotoxinas incluindo

anticorpos convencionais têm sido amplamente descritos na técnica. As toxinas podem ser acopladas aos anticorpos por técnicas convencionais de acoplamento, ou porções de toxina protéica contendo imunotoxinas podem ser produzidas como proteínas de fusão. Os anticorpos da presente invenção

5 podem ser usados de uma maneira correspondente para se obter tais imunotoxinas. Ilustrativos de tais imunotoxinas são aqueles descritos por Byers, *Seminars Cell. Biol.* 2 (1991), 59-70 e por Fanger, *Immunol. Today* 12 (1991), 51-54.

A proteína de fusão acima descrita pode ainda compreender

10 um ligador clivável ou sítio de clivagem para as proteínases. Estes componentes espaçadores, por sua vez, podem ser ou insolúveis ou solúveis [Diener *et al.*, *Science* 231 (1986), 148] e podem ser selecionados para possibilitar a liberação do medicamento do antígeno no sítio alvo. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser acoplados aos anticorpos e antígenos

15 da presente invenção para a imunoterapia, são medicamentos, radioisótopos, lectinas e toxinas. Os medicamentos que podem ser conjugados aos anticorpos e antígenos da presente invenção incluem compostos que são classicamente referidos como medicamentos tais como a mitomicina C, a daunorrubicina e a vinblastina. No uso de anticorpos ou antígenos

20 radioisotopicamente conjugados da invenção, por exemplo na imunoterapia, certos isótopos podem ser mais preferíveis do que outros, dependendo de fatores tais como a distribuição, bem como a estabilidade e a emissão de leucócitos.

Dependendo da resposta autoimune, alguns emissores podem

25 ser preferíveis a outros. Em geral, as partículas α e β emitindo radioisótipos são preferidas na imunoterapia. Preferidos são os emissores α de faixa curta, alta energia, tais como o ^{212}Bi . Exemplos de radioisótipos que podem ser ligados aos anticorpos ou antígenos da invenção para fins terapêuticos são ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd e ^{188}Re . Outros agentes

terapêuticos que podem ser acoplados ao anticorpo ou antígeno da invenção, bem como os protocolos terapêuticos *ex vivo* e *in vivo*, são conhecidos, ou pode ser facilmente determinados, por aqueles de experiência normal na técnica. Quando quer que seja apropriado, a pessoa habilitada na técnica pode

5 usar um polinucleotídeo da invenção codificando qualquer um dos anticorpos, antígenos ou os vetores correspondentes acima descritos, ao invés do próprio material proteináceo.

Consequentemente, a atividade biológica do anticorpo e o domínio de ligação aqui identificado sugerem que eles tenham suficiente

10 afinidade para torná-los candidatos potenciais para a localização do medicamento nas células expressando as estruturas superficiais apropriadas da célula e tecido doentes, respectivamente. Este alvejamento e ligação às células podem ser úteis para a liberação de agentes terapêutica ou diagnosticamente ativos e terapia de genes/liberação de genes. Moléculas/partículas com um

15 anticorpo da invenção devem ligar-se especificamente às células/tecidos que expressem o antígeno NY-ESO-1 e, portanto, podem ter uso diagnóstico e terapêutico. Assim, o anticorpo ou o antígeno da presente invenção podem ser rotulados (por exemplo, fluorescente, radioativo, enzima, magnético nuclear, metal pesado) e usados para detectar alvos específicos *in vivo* ou *in vitro*

20 incluindo “imunoquímica” como ensaios *in vitro*. *In vivo* eles podem ser usados de uma maneira similar às técnicas de formação de imagem da medicina nuclear para detectar tecidos, células ou outro material que expresse o antígeno NY-ESO-1. Assim, em uma outra forma de realização, a presente invenção diz respeito ao uso de um anticorpo da presente invenção ou

25 fragmento de ligação do mesmo para a preparação de uma composição para detecção ou alvejamento *in vivo* de um agente terapêutico e/ou diagnóstico a um tumor.

Além disso, a presente invenção diz respeito a composições compreendendo o anticorpo ou fragmento de ligação ou antígeno da presente

invenção acima mencionados ou seus derivados químicos, ou o polinucleotídeo, vetor ou célula da invenção. A composição da presente invenção pode ainda incluir um veículo farmacêuticamente aceitável. A expressão “derivado químico” descreve uma molécula que contém

5 componentes químicos adicionais que não fazem parte normalmente da molécula de base. Tais componentes podem melhorar a solubilidade, a meia-vida, a absorção etc. da molécula de base. Alternativamente, os componentes podem atenuar efeitos colaterais indesejáveis da molécula de base ou reduzir a toxicidade da molécula de base. Além disso, a composição farmacêutica da

10 presente invenção pode compreender ainda agentes antitumorais tais como as interleucinas ou os interferons, dependendo do uso pretendido da composição farmacêutica. Consequentemente, em uma forma de realização particular preferida, a presente invenção diz respeito ao uso do anticorpo ou fragmento de ligação da presente invenção ou de uma molécula de ligação tendo

15 substancialmente as mesmas especificidades de ligação de qualquer um destes, o antígeno, o polinucleotídeo, o vetor ou a célula da presente invenção, para a preparação de uma composição farmacêutica ou diagnóstica para a preparação de uma composição farmacêutica ou diagnóstica para tratar ou prevenir o desenvolvimento de um tumor; para a melhora dos sintomas

20 associados com um tumor; para diagnosticar ou examinar um paciente quanto à presença de um tumor ou para determinar o risco do paciente de desenvolver um tumor. Referida composição farmacêutica pode ser planejada para ser administrada pelas vias intravenosa, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intranasal, parenteral ou como um aerossol; ver também

25 abaixo.

Consequentemente, em uma forma de realização, a presente invenção diz respeito a um método de tratar ou prevenir o desenvolvimento de um tumor em um paciente; para melhorar os sintomas associados com um tumor; para diagnosticar ou examinar um paciente quanto à presença de um

tumor ou para determinar o risco do paciente de desenvolver um tumor, método este que compreende administrar ao referido paciente uma quantidade eficaz de qualquer um dentre os anticorpos, antígenos, polinucleotídeos, vetores ou células da presente invenção, acima descritos. Em particular, as

5 aplicações terapêuticas e diagnósticas de acordo com a presente invenção incluem melanoma e câncer de mamas, e são as mais adequadas para uso em alvejar um tumor compreendendo carcinoma de mamas primário e/ou metástases. A menos que de outra forma estabelecido, os termos “tumor”, “câncer”, “carcinoma” e outros são aqui usados intercambiavelmente.

10 Daí, a presente invenção inclui qualquer uso de uma molécula de ligação a antígeno tumoral compreendendo pelo menos uma CDR do anticorpo humano acima descrito, em particular para diagnosticar e/ou tratar de um distúrbio relacionado a um tumor. Preferivelmente, referida molécula de ligação é um anticorpo da presente invenção ou uma sua cadeia de

15 imunoglobulina. Além disso, a presente invenção diz respeito a anticorpos anti-idiotípicos de qualquer um dos anticorpos mencionados anteriormente aqui descritos. Estes são anticorpos ou outras moléculas de ligação que se ligam à sequência de peptídeos antigênicos únicos localizada em uma região variável de anticorpos próxima ao sítio de ligação do antígeno.

20 Em outra forma de realização, a presente invenção diz respeito a uma composição para diagnóstico compreendendo qualquer um dos anticorpos acima descritos, fragmentos de ligação a antígeno, polinucleotídeos, vetores ou células da invenção e, opcionalmente, meios adequados para detecção, tais como reagentes convencionalmente usados em

25 métodos imuno ou de diagnósticos com base em ácido nucleico. Os anticorpos da invenção são, por exemplo, adequados para uso em imunoensaios nos quais eles podem ser utilizados na fase líquida ou ligados a um veículo de fase sólida. Exemplos de imunoensaios que podem utilizar o anticorpo da invenção são os imunoensaios competitivos e não competitivos

ou em um formado direto ou indireto. Exemplos de tais imunoenaios são o radioimunoensaio (RIA), o sanduíche (ensaio imunométrico), citometria de fluxo e o ensaio Western blot. Os antígenos e os anticorpos da invenção podem ser ligados a muitos veículos diferentes e usados para isolar células especificamente a eles ligadas. Exemplos de veículos bem conhecidos incluem o vidro, o poliestireno, cloreto de polivinila, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, náilon, amiloses, as celuloses naturais e as modificadas, as poliacrilamidas, agaroses e magnetita. A natureza do veículo pode ser ou solúvel ou insolúvel para os fins da invenção. Existem muitos diferentes rótulos e métodos de rotulagem conhecidos daqueles de experiência normal na técnica. Exemplos dos tipos rótulos que podem ser usados na presente invenção incluem enzimas, radioisótopos, metais coloidais, compostos fluorescentes, compostos quimioluminescentes e compostos bioluminescentes; ver também as formas de realização aqui mais acima examinadas.

Por uma outra forma de realização, os anticorpos de ligação da presente invenção podem também ser usados em um método para o diagnóstico de um tumor em um indivíduo, mediante a obtenção de uma amostra de fluido corporal do indivíduo testado, que pode ser uma amostra de sangue, uma amostra de linfa ou qualquer outra amostra de fluido corporal, e fazendo o contato da amostra de fluido corporal com um anticorpo da presente invenção sob condições que permitam a formação dos complexos de anticorpo-antígeno. O nível de tais complexos é então determinado por métodos conhecidos na técnica, um nível significativamente mais elevado do que aquele formado em uma amostra de controle indicando o tumor no indivíduo testado. Da mesma maneira, o antígeno específico ligado pelos anticorpos da invenção pode também ser usado. Assim, a presente invenção diz respeito a um imunensaio *in vitro* compreendendo o anticorpo ou o antígeno da invenção. Uma forma de realização preferida da presente

invenção diz respeito à determinação do câncer, melanoma e câncer de mamas em particular. Os métodos envolvem ensaiar quanto a NY-ESO-1.

Em uma forma de realização, a presente invenção diz respeito a um método para determinar o estado de uma condição cancerosa, por exemplo regressão, progressão do começo de uma condição cancerosa em um paciente com um tumor que expresse o antígeno tumoral (associado) NY-ESO-1, compreendendo ensaiar uma amostra tomada do referido paciente quanto aos anticorpos, que especificamente se ligue ao referido antígeno, e comparando-se um valor obtido com um valor anterior obtido em seguida ao ensaio de uma amostra anterior tomada do referido paciente, qualquer diferença entre elas sendo indicativo de uma mudança no estado da referida condição cancerosa. Um método correspondente que pode ser empregado de acordo com a presente invenção é apresentado no pedido internacional WO 01/07917. Alternativamente, tal método pode ser realizado com um anticorpo da presente invenção.

Em outra forma de realização, a presente invenção diz respeito a um método para determinar células de câncer, por exemplo células de câncer mamário, em uma amostra, compreendendo ensaiar referida amostra para expressão de NY-ESO-1 mediante o ensaio quanto à presença da proteína de NY-ESO-1 com um anticorpo da presente invenção, em que a expressão de NY-ESO-1 é indicativo da presença de células de câncer na referida amostra. Um método semelhante que pode ser adaptado de acordo com a presente invenção é descrito na Patente U.S. nº 6.338.947 para SCP-1, NY-ESO-1 e SSX-2.

Neste contexto, a presente invenção também diz respeito a meios especificamente projetados para este fim. Por exemplo, uma disposição à base de proteína ou de anticorpo pode ser usada, a qual é, por exemplo, carregada ou com o antígeno da presente invenção de modo a detectar autoanticorpos que possam estar presentes nos pacientes que estejam sofrendo

de um tumor, em particular metástases, ou com anticorpos ou moléculas equivalentes de ligação a antígenos da presente invenção. O projeto de imunoensaios de microdisposições é resumido em Kusnezow *et al.*, *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Consequentemente, a presente invenção

5 também diz respeito a microdisposições carregadas com anticorpo ou antígeno da presente invenção.

A presente invenção também provê uma embalagem ou kit farmacêutico e diagnóstico, respectivamente, compreendendo um ou mais recipientes enchidos com um ou mais dos ingredientes acima descritos, isto é,

10 anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo, antígeno, polinucleotídeo, vetor ou célula da presente invenção. Associado com tal(is) recipiente(s) pode haver uma nota na forma prescrita por uma agência governamental que regule a fabricação, o uso ou a venda dos produtos farmacêuticos ou biológicos, nota esta que reflita a aprovação, pela agência, da fabricação, uso ou venda para

15 administração humana. Além disso, ou alternativamente, o kit compreende reagentes e/ou instruções para uso em ensaios diagnósticos apropriados. A composição, isto é, o kit da presente invenção é naturalmente particularmente adequado para o diagnóstico, prevenção e tratamento de um distúrbio que esteja acompanhado com a presença de antígeno NY-ESO associado com

20 tumor, em particular aplicável para o tratamento de tumores, como mencionado acima.

Os termos “tratamento”, “tratar” e outros são aqui usados para denotar geralmente a obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profilático em termos de prevenir completa ou

25 parcialmente uma doença ou seu sintoma e/ou pode ser terapêutico em termos de curar parcial ou completamente uma doença e/ou efeito adverso atribuído à doença. O termo “tratamento”, como aqui usado, cobre qualquer tratamento de uma doença em um mamífero, particularmente um ser humano, e inclui:

(a) prevenir a doença de ocorrer em um indivíduo que possa estar a ela

predisposto mas que não tenha sido ainda diagnosticado como tendo-a; (b) inibir a doença, isto é, deter seu desenvolvimento; ou (c) abrandar a doença, isto é, causar a regressão da doença. Além disso, o termo “indivíduo” ou “paciente” referem-se a um mamífero, de preferência um ser humano, em
5 necessidade de tratamento para uma condição, distúrbio ou doença.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser formuladas de acordo com métodos bem conhecidos na técnica; ver, por exemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (2000) pela University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Exemplos de
10 veículos farmacêuticos adequados são bem conhecidos na técnica e incluem soluções salinas tamponadas de fosfato, água, emulsões, tais como emulsões oleosas/aquosas, vários tipos de agentes umectantes, soluções estéreis, etc. As composições que contenham tais veículos podem ser formuladas por métodos convencionais bem conhecidos. Estas composições farmacêuticas podem ser
15 administradas ao indivíduo em uma dose adequada. A administração das composições adequadas podem ser efetuadas por diferentes meios, por exemplo por administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. As formulações em aerossol, tais como as formulações de pulverização nasal, incluem soluções aquosas purificadas
20 ou outras do agente ativo com agentes preservativos e agentes isotônicos. Tais formulações são preferivelmente ajustados a um pH e estado isotônico compatíveis com as membranas mucosas nasais. As formulações para administração retal ou vaginal podem ser apresentadas como um supositório com um veículo adequado.

25 O regime de dosagem será determinado pelo médico atendente e por fatores clínicos. Como é bem conhecido nas artes médicas, as dosagens para qualquer um paciente depende de muitos fatores, incluindo a estatura do paciente, a área da superfície corporal, a idade, o composto particular a ser administrado, o sexo, o tempo e a via de administração, a saúde geral, e outros

medicamentos que estejam sendo administrados presentemente. Uma dose típica pode ser, por exemplo, na faixa de 0,001 a 1000 μg (ou de ácido nucleico para expressão ou para inibição da expressão nesta faixa); entretanto, doses abaixo ou acima desta faixa de exemplo são previstas, especialmente considerando os fatores acima mencionados. Geralmente, o regime como uma administração regular da composição farmacêutica deve situar-se na faixa de 1 μg a 10 mg de unidades por dia. Se o regime for uma infusão contínua, ele deve também situar-se na faixa de 1 μg a 10 mg de unidades por quilograma de peso corporal por minuto, respectivamente. O desenvolvimento pode ser monitorado por avaliação periódica. As preparações para administração parenteral incluem as soluções, suspensões e emulsões aquosas ou não aquosas estéreis. Exemplos de solventes não aquosos são o propileno glicol, o polietileno glicol, óleos vegetais tais como o azeite, e ésteres orgânicos injetáveis tais como o oleato de etila. Veículos aquosos incluem a água, soluções, emulsões ou suspensões alcoólicas/aquosas, incluindo solução salina e meios tamponados. Veículos parenterais incluem a solução de cloreto de sódio, a dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, de Ringer lactado, ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem os reabastecedores fluídicos e nutrientes, reabastecedores de eletrólitos (tais como aqueles com base na dextrose de Ringer), e outros. Preservativos e outros aditivos podem também estar presentes, tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes de quelação, e gases inertes e outros. Além disso, a composição farmacêutica da invenção pode compreender outros agentes tais como os agentes antitumorais e os medicamentos citotóxicos, dependendo do uso pretendido da composição farmacêutica. Além disso, a composição farmacêutica pode também ser formulada como uma vacina, por exemplo se a composição farmacêutica da invenção compreender um anticorpo da presente invenção para imunização passiva, ou antígeno cognato para imunização ativa. As formulações de vacina para o tratamento do câncer empregando

antígenos associados ao tumor, tais como o NY-ESO-1, são descritas, por exemplo, no pedido internacional WO 2005/105139. Além disso, a coadministração ou a administração sequencial de outros agentes pode ser desejável.

5 Uma dose ou quantidade terapeuticamente eficaz refere-se àquela quantidade do ingrediente ativo suficiente para melhorar os sintomas ou a condição. A eficácia e a toxicidade terapêuticas de tais compostos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão nas culturas
10 celulares ou em animais experimentais, por exemplo ED50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50 % da população), e LD50 (a dose letal para 50 % da população). A relação em dose entre os efeitos terapêuticos e os tóxicos é o índice terapêutico, e pode ser expressa como a relação LD50/ED50. Preferivelmente, o agente terapêutico na composição se acha presente em uma
15 quantidade suficiente para prevenir a metástase e o crescimento neoplástico das células.

 As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção podem preferivelmente ser usadas para o tratamento de tumores e câncer, incluindo, porém sem limitar, melanoma, câncer mamário primário, carcinoma hepatocelular, e metástases.

20 Estas e outras formas de realização são apresentadas e incluídas pela descrição e pelos exemplos da presente invenção. Outra literatura concernente a qualquer um dos materiais, métodos, usos e compostos a serem empregados de acordo com a presente invenção, podem ser recuperados das bibliotecas públicas e bancos de dados, com o uso, por
25 exemplo, de dispositivos eletrônicos. Por exemplo, o banco de dados público “Medline” pode ser utilizado, o qual é abrigado pelo National Center for Biotechnology Information e/ou pelo National Library of Medicine nos National Institutes of Health. Outros bancos de dados e endereços da web, tais como aqueles do European Bioinformatics Institute (EBI), que faz parte do

European Molecular Biology Laboratory (EMBL), são conhecidos da pessoa versada na técnica e podem também ser obtidos com o uso de utilitários de pesquisa da internet. Uma vista geral da informação da patente em biotecnologia e um exame das fontes relevantes da informação de patente
5 úteis para a pesquisa retrospectiva e para o conhecimento corrente, são dados em Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

A apresentação acima geralmente descreve a presente invenção. A menos que de outra forma estabelecido, um termo, como aqui usado, fornece a definição como fornecida no Oxford Dictionary of
10 Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisto em 2000 e reimpresso em 2003, ISBN 0 19 850673 2. Vários documentos são citados na totalidade do texto deste relatório descritivo. Citações bibliográficas completas podem ser encontradas no final deste relatório
15 descritivo imediatamente antes das reivindicações. Os conteúdos de todas as referências citadas (incluindo as referências da literatura, patentes emitidas, pedidos de patentes publicados como citados na totalidade deste relatório
descritivo, e especificações, instruções, etc. do fabricante) são aqui expressamente incorporados como referência; no entanto, não existe qualquer
20 indício de que qualquer documento citado seja de fato técnica anterior de acordo com a presente invenção.

Um entendimento mais completo pode ser obtido com referência aos seguintes exemplos específicos, os quais são aqui fornecidos para fins de ilustração apenas e não se pretende com eles limitar o escopo da
invenção.

25

EXEMPLOS

Os exemplos que seguem ainda ilustram a invenção, mas não devem ser interpretados de modo a limitar o escopo desta sob qualquer forma. As descrições detalhadas dos métodos convencionais, tais como aquelas aqui empregadas, podem ser encontradas na literatura citada; ver, também, "*The*

Merck Manual of Diagnosis and Therapy” Décima Sétima Edição, editada por Beers e Berkow (Merck & Co., Inc. 2003).

A prática da presente invenção empregará, a menos que de outra forma indicado, técnicas convencionais da biologia celular, da cultura celular, da biologia molecular, da biologia transgênica, da microbiologia, DNA recombinante e imunologia, as quais se acham dentro do conhecimento da técnica. Para outra elaboração das técnicas gerais úteis na prática desta invenção, o clínico pode referir-se a livros didáticos padrão e revisões na biologia celular e na cultura tecidual; ver também as referências citadas nos exemplos. Métodos gerais na bioquímica molecular e celular podem ser encontrados em tais livros didáticos padrão como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Edição (Sambrook *et al.*, Harbor Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª Edição (Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons 1999); *DNA Cloning*, Volumes I e II (Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (Gait ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (Hames e Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (Hames e Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (Freshney e Alan, Liss, Inc., 1987); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller e Calos, eds.); *Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology*, 3ª Edição (Ausubel *et al.*, eds.); e *Recombinant DNA Methodology* (Wu, ed., Academic Press). *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (Miller e Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Volumes 154 e 155 (Wu *et al.*, eds.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); o tratado *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer e Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I a IV (Weir e 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); e *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Reagentes, vetores de clonagem e kits para a manipulação genética referida neste relatório acham-se disponíveis de vendedores comerciais tais como a BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich e ClonTech. As técnicas gerais na cultura celular e na coleta de meios são delineadas em *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* [Carr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375]; e *Suspension Culture of Mammalian Cells* [Birch *et al.*, *Bioprocess Technol.* 19 (1990), 251]; *Extracting information from cDNA arrays*, Herzog *et al.*, *CHAOS* 11 (2001), 98-107.

Métodos Suplementares

Material Do Paciente

O material tumoral, bem como o tecido normal não necessário para a análise histopatológica de rotina, foram congelados em nitrogênio líquido. Soro e sangue para o isolamento das células de memória B foram colhidos do paciente C1 de acordo com a aquiescência informada que foi aprovada pelo comitê de Ética local e assinada pelo paciente.

Cultura Das Células De Memória B

As células de memória B foram isoladas dos linfócitos do sangue periférico humano mediante um procedimento de seleção de duas etapas. O marcador CD22 de células B pan foi usado para a seleção positiva das células B com o uso da tecnologia MACS (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemanha). Os PBL foram rotulados com o uso de mAbs CD22 anti-humano conjugado a MACS, IgD anti-humano de mAbs conjugado à ficoeritrina, e IgM, IgA, CD3, CD8, CD56 anti-humanos de anticorpos conjugados a APC

(Becton Dickinson, Basel, Suíça). As células B pan foram isoladas por seleção positiva de células positivas em CD22 usando um dispositivo MACS midi e colunas LS (Miltenyi), seguido pela seleção de células negativas de ficoeritrina e de APC com o uso de um separador celular MoFlo (DakoCytomation, Fort Collins, USA). As células B negativas em IgM, IgD, IgA positivas em CD22 foram então incubadas com EBV contendo o sobrenadante obtido das células B95-8 na presença de CpG 2006 (6, 15) no meio de células B contendo RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal de bezerro. As células foram semeadas a 50 células por reservatório em meio de células B em PBL de alimentação irradiado a 30.000 preparado de doadores voluntários.

Após 2 semanas de cultura, o meio condicionado de culturas de células de memória B foi ensaiado quanto à presença de anticorpos específicos de NY-ESO-1 por ELISA e nas seções de tecidos autólogos e não autólogos positivo em NY-ESO-1.

ELISA

Microplacas de 96 reservatórios de extração (Corning, NY, USA) foram revestidas com 25 µl/reservatório de uma proteína de NY-ESO-1 recombinante a 1 µg/ml em PBS durante a noite, em 4 °C. As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas durante a noite em 4 °C com PBS contendo 5 % de leite em pó (Rapilait, Migros, Suíça). As preparações de meio condicionado de células B, soro do paciente e anticorpo recombinante foram incubadas por 2 horas na temperatura ambiente. A ligação dos anticorpos humanos ao NY-ESO-1 foi determinada com o uso de um anticorpo secundário IgG-HRP anti-humano de asno (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, Reino Unido) seguida pela medição da atividade de HRP usando uma solução de substrato de TMB (TMB, Sigma, Buchs, Suíça).

ELISA de Mapeamento de Epítopo

Peptídeos 20meros abrangendo a proteína de NY-ESO-1

inteira com 10 aa de sobreposições compartilhadas por cada peptídeo adjacente (Peptides&Elephants, Nuthetal, Alemanha) foram usados para revestir placas Maxisorp de ELISA (Nunc, Rochester, NY). O anticorpo Manhattan recombinante humano ou soro do paciente (diluído a 1:500 em PBS) foram detectados com o uso de IgG+IgM anti-humano de Cabra conjugado a peroxidase de raiz forte (Jackson ImmunoResearch).

ELISA de Competição

Experiências de saturação identificaram a concentração de ligação meio-máxima do anticorpo Manhattan monoclonal de ser humano ao peptídeo NY-ESO-111-30 como 1×10^{-9} M ou 0,15 µg/ml. Nas experiências de competição, as concentrações crescentes de peptídeo NY-ESO-111-30 foram misturadas com Manhattan em uma concentração de 0,15 µg/ml e a mistura foi então transferida para placas de ELISA revestidas com NY-ESO-111-30.

Imunoistoquímica

Cilindros de tecidos tumorais medindo 0,6 mm de diâmetro foram puncionados do tecido tumoral positivo em NY-ESO-1 implantado em parafina e do tecido de controle saudável. Os pares formados de um cilindro de tecido tumoral e de tecido de controle saudável foram colocados em cada posição de uma grade de 2 x 4 cujas dimensões eram compatíveis com o formato microtitulador das placas de cultura de células B e pipetas de multicanais convencionais.

A imunoistoquímica foi realizada sobre tecido implantado parafina, fixado em formalina. A recuperação do antígeno com base no calor foi aplicada a todas as lâminas. A fluorescência não específica foi bloqueada com o uso de IgG anti-humano de coelho policlonal (Dako, Baar, Suíça) por 30 minutos na temperatura ambiente, seguido por um segundo bloqueio em 1 % de leite de baixa gordura (Rapilait, Migros, Suíça) por 10 minutos. O anticorpo primário ou meio condicionado de células B foi incubado durante a

noite em 4 °C. A ligação dos anticorpos humanos ao NY-ESO-1 foi revelada com o uso dos anticorpos secundários conjugados a Cy 3 ao IgG humano (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Soham, Reino Unido). O manchamento do anticorpo Manhattan humano recombinante biotinilado foi revelado com o uso de estreptavidina conjugada a Cy3 ou HRP (Sigma, Buchs, Suíça). Como controle positivo quanto à presença do antígeno de NY-ESO-1, um anticorpo monoclonal anti-NY-ESO-1 de camundongo (Zymed, South San Francisco, USA) foi usado.

A análise da imunofluorescência foi realizada em um microscópio de fluorescência invertida (Leica, Heerbrugg, Suíça).

Rt-Pcr De Célula Única

Células únicas obtidas de uma cultura de células de memória B foram depositadas em tubos de PCR. cDNA foi preparado com o uso de iniciadores específicos para as regiões constantes de cadeias pesada, κ -leve e γ -leve de imunoglobulina G. A amplificação de PCR das regiões variáveis de cadeia pesada e leve de imunoglobulina foi realizada de acordo com protocolos padrão (7, 16). As regiões variáveis de cadeia pesada e leve de imunoglobulina foram amplificadas com o uso de uma abordagem de PCR em semi-ninho. A PCR de primeira rodada foi realizada com iniciadores específicos para a região constante de IgG e conjuntos de iniciadores específicos para as regiões conservadas de estrutura 1 das famílias de região variável de Ig de cadeia pesada e leve (7). Subsequentemente, a PCR em semi-ninho com iniciadores em ninho específicos para a região constante de IgG e os iniciadores específicos para a estrutura 1 das famílias de região variável de Ig de cadeia pesada e leve que continham sítios de restrição foram usados como descrito (8). Os produtos de PCR de cadeia pesada e leve de imunoglobulina foram clonados nos vetores contendo a região constante de IgG1, IgCapa ou IgLambda.

Produção E Purificação De Anticorpos

Células renais embriônicas humanas 293-T foram cultivadas em DMEM suplementado com 10 % de IgG FCS ultrabaixo, 1 % de penicilina-estreptomicina e 1 % de L-glutamina (Invitrogen, Basel, Suíça). A
 5 cotransfecção com a cadeia pesada e leve de imunoglobulina codificando o DNA plasmídeo foi realizada pelo método padrão de precipitação de fosfato de cálcio. Depois disso, as células foram cultivadas em D-MEM livre de soro suplementado com 1 % de Nutridoma SP (Roche, Rotkreuz, Suíça). Os sobrenadantes foram coletados após 8 dias de cultura e a IgG foi purificada
 10 em uma coluna de proteína G (Amersham Biosciences, Upsala, Suécia) com o uso de cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) (Amersham Biosciences, Upsala, Suécia). O anticorpo purificado foi biotinilado seguindo-se as instruções dos fabricantes (SIGMA, Buchs, Suíça).

Células Tumorais Sk-Mel-37 De Imunofluorescência

15 Células SK-MEL-37 foram cultivadas sobre lâmina de microscópio, fixadas com formaldeído e permeabilizadas com 1 % de Triton X-100 por 10 minutos na temperatura ambiente. Após o bloqueio com 10 % de soro de cabra por 1 hora na temperatura ambiente, as células foram incubadas com Manhattan em uma concentração de 1 ug/ml ou anticorpo de
 20 controle negativo [hu8-18c5 (17) expresso na moda recombinante com uma região Fc humana] em PBS / 1 % de soro de cabra / 0,2 % de Triton X-100 durante a noite em 4°. Os anticorpos ligados foram observados por manchamento com Alexa Fluor® 546 de IgG anti-humano de cabra (1:300, *Molecular Probes*, Leiden, Países Baixos) por 1 hora na temperatura
 25 ambiente. A microscopia foi realizada com o uso de um microscópio Leica SP 5.

EXEMPLO 1

IDENTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS B ESPECÍFICAS DE NY-ESO-1 DO PBL DE UM PACIENTE DE MELANOMA

Um paciente de melanoma foi selecionado com um título de soro pra o NY-ESO-1 taa no ELISA e nas seções do linfonodo autólogas obtidas na biópsia. Após a vacinação com o vírus da vacínia recombinante expressando o NY-ESO-1 de comprimento completo, uma resposta clínica

5 parcial demonstrada pela regressão de duas metástases positivas em NY-ESO-1 no fígado foi observada. 50 ml de sangue periférico foram colhidos do paciente e as células B negativas na dupla IgM/IgD superficial representando as células M de memória alteradas em Ig foram isoladas e cultivadas após a imortalização usando um protocolo de transformação do vírus de Epstein Barr

10 modificado (6). 100.000 células B de memória foram obtidas e foram semeadas em placas microtituladoras de 96 reservatórios à razão de 50 células por reservatório. Após 3 semanas de crescimento da cultura, os clones foram observados nos reservatórios de cultura e o meio condicionado pelas culturas de células B foi ensaiado quanto à presença de anticorpos específicos a NY-

15 ESO-1. Como uma primeira triagem, um ELISA usando NY-ESO-1 recombinante de comprimento completo como antígeno foi realizado. Os sinais do ELISA eram classificados como positivos se eles excedessem o sinal de fundo por um fator de três. Isto identificou 9 reservatórios de células B de memória positivas quanto ao ELISA fora do total de 2000 reservatórios. Um

20 exemplo do sinal para a relação de ruído obtida com o ELISA é apresentado na Figura 1A. As culturas positivas quanto ao ELISA foram subsequentemente ensaiadas na imunoistoquímica usando-se o tecido tumoral positivo quanto ao NY-ESO-1. A configuração da tela tecidual consistiu de 8 pares de bastões de tecidos de tumores de mama positivos ao NY-ESO-1 e

25 tecidos de mamas saudáveis como controles montados sobre lâminas de vidro. Tendo em vista a miniaturização deste ensaio, 15 µl de meio condicionado de células B foram suficientes para realizar o ensaio. A capacidade de comparar o meio condicionado de várias culturas de células B de memória e dos controles negativos sobre uma lâmina única facilitou a avaliação do

manchamento de fluorescência.

A avaliação das 9 culturas de células B positivas quanto ao ELISA neste ensaio tecidual identificou uma cultura que produziu uma intensidade de manchamento mais elevada em comparação àquela dos outros 8. Isto é ilustrado na Figura 1B, em que a imunofluorescência obtida com a cultura 12D7 reativa ao tecido compara-se com a imunofluorescência obtida com o reservatório 9D1 que foi classificado como sendo não reativo ao tecido.

Uma vez que a informação da subclasse de IgG sobre o anticorpo específico de NY-ESO-1 deve ter sido perdida na etapa de clonagem molecular, ela foi determinada nesta etapa com o uso da imunoistoquímica com seções teciduais positivas ao NY-ESO-1 em combinação com IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 anti-humanos de anticorpos secundários específicos da subclasse. Como mostrado na Figura 1C, o manchamento tecidual quanto a NY-ESO-1 é apenas observado com um anticorpo secundário anti-IgG1.

EXEMPLO 2

CLONAGEM MOLECULAR DE UM ANTICORPO ESPECÍFICO DE NY-ESO-1 SECRETADO PELAS CÉLULAS B DE MEMÓRIA CULTIVADAS.

Tentativas anteriores na clonagem celular de células B de memória humana identificadas transformadas por EBV específica do antígeno não foram bem sucedidas. Portanto, de acordo com a presente invenção, foi iniciada em uma estratégia de clonagem molecular com base em RT-PCR de células únicas classificadas colhidas do reservatório 12D7, de modo a isolar o clone de anticorpo responsável pelo padrão de manchamento descrito acima. 32 células foram colhidas e depositadas como células únicas diretamente nos tubos de PCR.

Após a síntese do cDNA, as regiões variáveis de cadeia pesada

e leve da imunoglobulina humana foram amplificadas com o uso de uma abordagem de PCR em ninho (7). Sequências de cadeias pesadas e capa leves com 16 das 32 células classificadas foram obtidas. A PCR para as sequências variáveis de cadeia lambda leve não deram um produto com qualquer das células. A análise das sequências identificaram 4 clones de anticorpos distintos que foram numerados de acordo com sua abundância relativa. O clone 1 foi observado em oito das 16 células, o clone 2, em quatro células, e os clones 3 e 4, cada um, em duas células.

Foi depois determinado se um destes quatro clones, quando expresso como anticorpo recombinante, produzia um manchamento de NY-ESO-1 semelhante ao observado com o meio condicionado do reservatório 12D7 de cultura de células B. Para esse fim, as sequências variáveis de cadeia pesada e leve foram clonadas nos vetores de expressão de anticorpo que forneceram as regiões constantes da cadeia pesada de IgG1 humana e da cadeia leve capa humana (8). As regiões constantes de IgG1 foram usadas desde que o anticorpo específico de NY-ESO-1 identificado no meio condicionado do reservatório 12D7 foi determinado como sendo desta subclasse (Figura 1 C).

A análise funcional dos quatro clones foi realizada por reexame dos anticorpos no ELISA e nas seções teciduais positivas em NY-ESO-1. Para esse fim, a cadeia pesada e os vetores de expressão de cadeia leve correspondentes dos quatro clones foram transfectados em 293 células HEK, e o fluido sobrenadante das células transfectadas foi testado diretamente no ELISA e na imunoistoquímica. Todos os quatro fluidos sobrenadantes produziram IgG1 funcional testado no ELISA de IgG anti-humano. Enquanto os clones 1 a 3 não apresentaram qualquer ligação ao NY-ESO-1 no ELISA, o clone número 4 foi positivo até a última diluição testada (1/100) (Figura 2A). Este clone também apresentou um manchamento específico na imunoistoquímica com o uso das seções teciduais positivas a

NY-ESO-1 (Figura 2B).

Isto foi interpretado como confirmação de que a sequências das regiões variáveis de imunoglobulina do anticorpo original específico de NY-ESO-1 como havia ocorrido no paciente, haviam sido recuperadas. Por causa da simplicidade, o clone 12D7No.4 foi denominado “Manhattan” e usado para outra caracterização com o uso de material purificado de proteína G obtido de células HEK transientemente transfectadas.

EXEMPLO 3

ANTICORPO MANHATTAN MONOCLONAL HUMANO

ESPECÍFICO DE NY-ESO-1 SE LIGA AO PEPTÍDEO NY-ESO-1₁₁₋₃₀ COM UMA KD DE 10^{-10}

Para identificar o epítopo reconhecido por Manhattan em NY-ESO-1, o ELISA foi realizado com o uso de peptídeos de sobreposição abrangendo a proteína NY-ESO-1 completa. Como mostrado na Figura 3A, o Manhattan se liga a um peptídeos representando os aminoácidos 11 a 30 da proteína NY-ESO-1, mas não aos dois peptídeos adjacentes que abrangem os aminoácidos 1 a 20 ou 21 a 40. Isto sugere que o epítopo reconhecido por Manhattan se situa na junção destes dois peptídeos ao redor do aminoácido 20 de NY-ESO-1. Este epítopo, entre outros, foi também reconhecido pelos anticorpos contidos no soto do paciente C1 (Figura 3B).

A avidéz do Manhattan foi determinada pelo ELISA de competição com o uso de concentrações crescentes do peptídeos NY-ESO-1₁₁₋₃₀ solúvel para competir quanto ao peptídeo ligado à placa. Como apresentado na Figura 3C, a constante de dissociação (KD) do equilíbrio de ligação a antígeno da interação do Manhattan com seu peptídeo cognato, foi na faixa nanomolar inferior.

Como um ensaio final usado na caracterização do anticorpo Manhattan monoclonal humano, a análise de imunofluorescência de Manhattan na linhagem celular SK-MEL-37 positiva em NY-ESO-1 foi

realizada (9). O manchamento desta linhagem celular com Manhattan resultou em um sinal nuclear que localizou-se com o manchamento obtido com o marcador nuclear Hoechst.

Conclusão

5 As experiências acima fornecem um método geral para a identificação e a clonagem molecular de anticorpos diretamente dos linfócitos do sangue periférico (PBLs) de indivíduos humanos. O método da presente invenção pode ser provado pelo isolamento de um anticorpo monoclonal humano para antígeno NY-ESO-1 associado ao tumor de um paciente de melanoma. Iniciando-se com a triagem dos anticorpos secretados pelas 10 culturas de curto prazo, as culturas de células B de memória humanas imortalizadas que foram positivas no ELISA e na imunoistoquímica no tecido positivo em NY-ESO-1, foram identificadas. Este exame primário foi seguido por uma etapa de clonagem molecular, cujo fim foi identificar e isolar o clone 15 único de células B que secretaram o anticorpo detectado na triagem primária. A presença de apenas 4 diferentes clones no reservatório 12D7 como revelado pela análise de sequência após a RT-PCR de célula única, sugere que, das 50 células iniciais que foram semeadas, apenas poucas haviam sido imortalizadas e sobreviveram.

20 Um exame secundário subsequente dos anticorpos candidatos recombinantes resultou na identificação de um único anticorpo monoclonal com um padrão de manchamento idêntico ao do anticorpo original que foi produzido pelas células B de memória cultivadas derivadas do paciente PBL. Assim, um anticorpo como ocorrera originalmente no paciente, pode com 25 sucesso ser recuperado. Este anticorpo, cunhado “Manhattan” reconhece um epítipo N-terminal ao redor da posição 20 do aminoácido, que é compartilhado entre NY-ESO-1 e o LAGE-1 taa (9). Este epítipo é também reconhecido por soro do paciente C1 suportando a noção do Manhattan como sendo uma cópia genuína de um anticorpo que ocorrera no paciente.

Desde então, até esta data, Manhattan é o primeiro anticorpo monoclonal humano para NY-ESO-1, podendo também ser o primeiro anticorpo amadurecido de afinidade derivado do paciente para um antígeno tumoral e taa, respectivamente. Este novo método da presente invenção contorna algumas das dificuldades inerentes à transformação de EBV das células B, tais como a instabilidade genética e a fraca eficiência de clonagem (6, 10). Embora o isolamento dos anticorpos monoclonais humanos das células B de memória imortalizadas em EBV tenha sido realizado com sucesso em um estudo anterior (6), é digno de nota mencionar que esforços anteriores tentaram, antes do método descrito acima da presente invenção, o isolamento dos anticorpos específicos de NY-ESO-1 do mesmo paciente com o uso da transformação de EBV, e as técnicas de clonagem celular falharam a despeito de um considerável número de culturas de células B de memória identificadas na triagem celular.

Um segundo objeto da presente invenção foi o isolamento de um anticorpo para o antígeno NY-ESO-1 associado com o tumor com reatividade tecidual. Isto foi motivado pela observação de que o soro do paciente continha anticorpos que reagiam com o tecido autólogo positivo em NY-ESO-1 retirado na biópsia. Para esse fim, a tecnologia de microarranjos foi adaptada para a triagem das culturas de células B de memória. Isto teve várias vantagens em comparação com os métodos clássicos de imunoistoquímica. Primeiro, a disponibilidade sobre uma lâmina única de várias posições de réplicas possibilitando o ensaio e para comparar várias amostras. Segundo, a possibilidade de se colocar tecido positivo adjacente ao tecido negativo melhora grandemente a sensibilidade do ensaio, um aspecto que foi crucial uma vez que a incubação com meio condicionado de culturas de células B de memória frequentemente resultou em manchamento muito fraco. Terceiro, esta miniaturização do formato do ensaio necessita muito menos de meio condicionado, o que também é um fator decisivo tendo em

vista que o volume da cultura das culturas de células B de memória foi geralmente de menos do que 200 µl.

A observação de que o soro do paciente e o anticorpo
Manhattan monoclonal humano reconheceu seções teciduais fixas pode ser
5 irrelevante para a situação *in vivo*, pelo menos com respeito a um papel
terapêutico direto através da indução dos mecanismos efetores imunes
induzidos pelo anticorpo atuando sobre um nível celular para purificar as
células positivas quanto a NY-ESO-1. O NY-ESO-1 foi descrito como um
antígeno intracelular (11) e foi observado neste estudo estar localizado no
10 núcleo, pelo menos na linhagem celular SK-Me-37. Neste contexto, o
manchamento superficial sobre SK-Me-37 vivo usando Manhattan
biotinilado, foi negativo.

O isolamento do Manhattan constitui uma etapa principal em
direção à avaliação da significância terapêutica dos anticorpos específicos do
15 tumor derivado do paciente. Existem vários aspectos concebíveis de acordo
com os quais um tal anticorpo pode mediar efeitos terapêuticos. Primeiro, ele
pode servir como um adjuvante para futuros protocolos de vacina. Complexos
imune formados após a administração do Manhattan com NY-ESO-1 podem
resultar em uma indução aumentada das respostas imunes celulares (12).

20 Uma segunda possibilidade trata do papel fisiopatológico desta
classe de anticorpos em pacientes de tumor. O NY-ESO-1 frequentemente
induz as respostas humorais que se correlacionam com um mau prognóstico
para o paciente (13). Embora isto possa ser uma mera correlação por causa da
abundância aumentada de antígeno conforme o tumor cresça, um papel
25 tolerogênico desta resposta de células B pode também ser concluído por
hipótese. De acordo com este aspecto, o antígeno livre liberado por células
tumoriais necróticas ou apoptóticas deve induzir uma forte resposta de células
B, as células B então devem apresentar o antígeno como um resultado da
absorção mediada pelo receptor Fc dos complexos imune (14). Como as

células B podem ser APC fracas, esta apresentação pode resultar na indução da tolerância das células T reativas a NY-ESO-1 e, assim, prevenir a rejeição tumoral. A administração, em uma fase prematura da progressão tumoral, dos F(ab)s Manhattan recombinantes, pode romper a absorção do antígeno pelas células B porque F(ab)s não são ligados pelos receptores Fc, mas devem ainda capturar antígeno. Isto, por sua vez, pode prevenir a indução da tolerância nas células T específicas de NY-ESO-1.

REFERÊNCIAS

1. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. E Pfreundschuh, M. *Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 11810-11813, 1995.
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. e Knuth, A. *Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-I: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes.* *J Exp Med.* 187: 265-270, 1998.
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., 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., Gnjjatic, S., Hoffman, E. W., Old, L. J. e Cebon, J. S. *Recombinant NY-ESO-I 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.
6. Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M. R., Murphy, B. R., Rappuoli, R. e 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.
7. Owens, G. P., Ritchie, A. M., Burgoon, M. P., Williamson,

- R. A., Corboy, J. R. e 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.
- 5 8. Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E. e Nussenzweig, M. C. *Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science*, 301: 1374-1377, 2003.
9. Chen, Y. T., Gure, A. O., Tsang, S., Stockert, E., Jager, E., Knuth, A. E 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.
- 10 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. e 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.
- 15 12. Woelbing, F., Kostka, S. L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C, Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A. P., Knop, J., Udey, M. C. e 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.
- 20 13. Jager, E., Stockert, E., Zidianakis, Z., Chen, Y. T., Karbach, J., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Old, L. J. e 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.
- 25 14. Preiss, S., Kammertoens, T., Lampert, C., Willimsky, G. e Blankenstein, T. *Tumor-induced antibodies resemble the response to tissue*

damage. *Int. J. Cancer*, 115: 456-462, 2005.

15. Hartmann, G. e Krieg, A. M. *Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. J Immunol.*, 164: 944-953, 2000.

5 16. Barbas III, C. F. *Phage Display A Laboratory Manual.*, Dennis R. Burton, Jamie K. Scott e Gregg J. Silverman (eds.) 2001. Dennis R. Burton, Jamie K. Scott e Gregg J. Silverman (eds.) 2001.

10 17. Schluesener, H. J., Sobel, R. A., Linington, C. e 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.

REIVINDICAÇÕES

1. ANTICORPO HUMANO-MURINO QUIMÉRICO OU XEGOGENEICO, HUMANIZADO, HUMANO OU SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, que é capaz de reconhecer o antígeno NY-ESO-1 associado ao tumor, **caracterizado** pelo fato de compreender em sua região de cadeia pesada variável, regiões determinantes de complementaridade CDR1 de SEQ ID NO. 5, CDR2 da SEQ ID NO. 6 e CDR3 da SEQ ID NO. 7 e na sua região de cadeia leve variável, as regiões determinantes de complementaridade CDR1 da SEQ ID NO.8, CDR2 da SEQ ID NO. 9 e CDR3 da SEQ ID NO. 10.

2. ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ligar um epítopo definido por uma sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO. 11.

3. ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de ser selecionado a partir do grupo consistindo em um fragmento Fv de cadeia única (scFv), um fragmento F(ab'), um fragmento F(ab) e um fragmento F(ab')₂.

4. ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de compreender a sequência de aminoácidos de (VH) (SEQ ID NO. 2) e/ou região (VL) (SEQ ID NO. 4).

5. VETOR DE EXPRESSÃO, **caracterizado** pelo fato de compreender um polinucleotídeo de SEQ ID Nos. 5 a 10, conforme descritos nas reivindicações 1 a 4, que codifica a região variável de uma cadeia de imunoglobulina do anticorpo ou fragmento de ligação, e que codifica a região variável de outra cadeia de imunoglobulina do dito anticorpo.

6. MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, **caracterizado** pelo fato de compreender um vetor de expressão, como definido na reivindicação 5.

7. MÉTODO PARA PREPARAR UM ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, **caracterizado** pelo fato de compreender:

5 (a) o cultivo do microrganismo como definido na reivindicação 6; e

(b) o isolamento do referido anticorpo ou fragmento de ligação a partir da cultura.

8. COMPOSIÇÃO, **caracterizada** pelo fato de compreender o anticorpo ou fragmento de ligação, como
10 definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, o vetor de expressão, como descrito na reivindicação 5 ou microrganismo transgênico, como definido na reivindicação 6.

9. COMPOSIÇÃO DE DIAGNÓSTICO, **caracterizada** pelo
15 fato de compreender o anticorpo ou fragmento de ligação, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, o vetor de expressão, como descrito na reivindicação 5 ou microrganismo transgênico, como definido na reivindicação 6 e, opcionalmente, reagentes convencionalmente usados em
20 métodos diagnósticos com base imuno ou de ácido nucléico.

10. USO DO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou um anticorpo idiotípico de qualquer um dos mesmos, o vetor de expressão, como descrito na reivindicação 5 ou
25 microrganismo transgênico, como definido na reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para tratar ou prevenir a progressão de um tumor, para a melhora dos sintomas associados com um tumor; para diagnosticar ou examinar um paciente quanto à presença
30 de um tumor, ou para determinar o risco do paciente de desenvolver um tumor.

11. USO DO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou um anticorpo anti-idiotípico correspondente, **caracterizado**

pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o diagnóstico e/ou tratar um tumor.

12. KIT PARA O DIAGNÓSTICO DE UM TUMOR, **caracterizado** pelo fato de compreender o anticorpo ou
5 fragmento de ligação, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, o vetor de expressão, como descrito na reivindicação 5 ou microrganismo transgênico, como definido na reivindicação 6 e, opcionalmente reagentes e/ou instruções para uso.

10 13. USO DA MOLÉCULA DE ANTÍGENO LIGANTE AO TUMOR, **caracterizado** pelo fato de compreender um anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, para a preparação de um medicamento para a detecção in vivo de ou direcionamento de um agente terapêutico e/ou de diagnóstico
15 para um tumor.

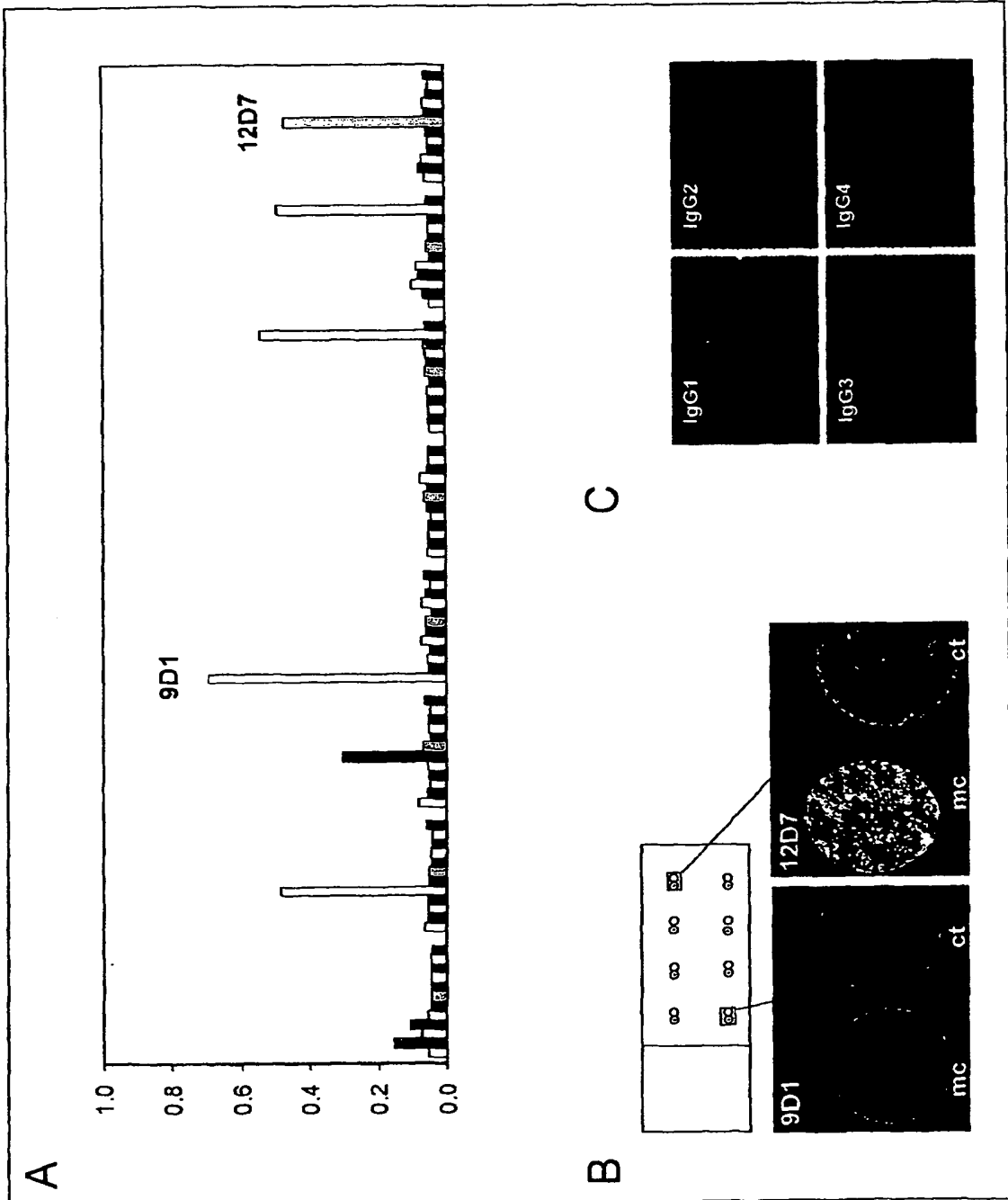


Fig. 1

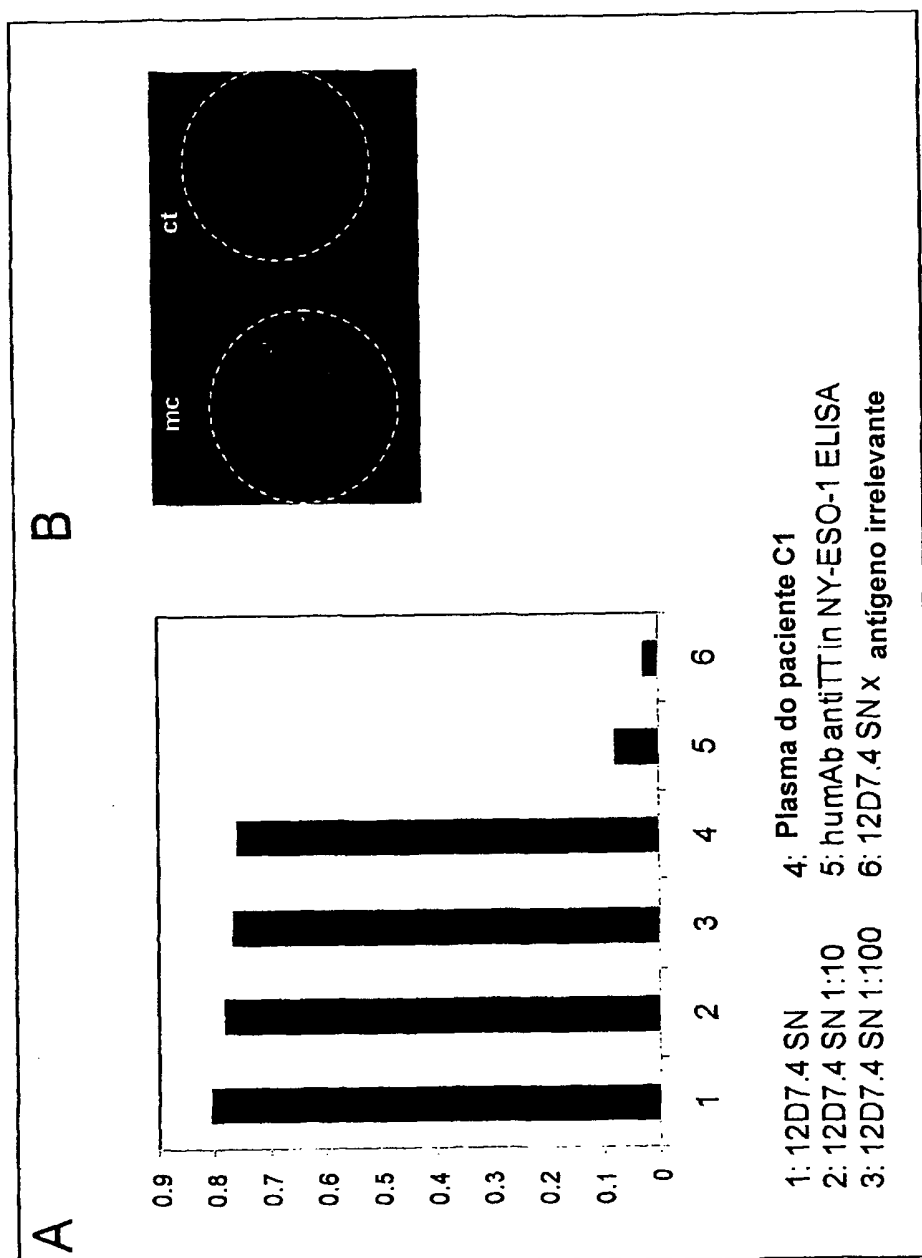
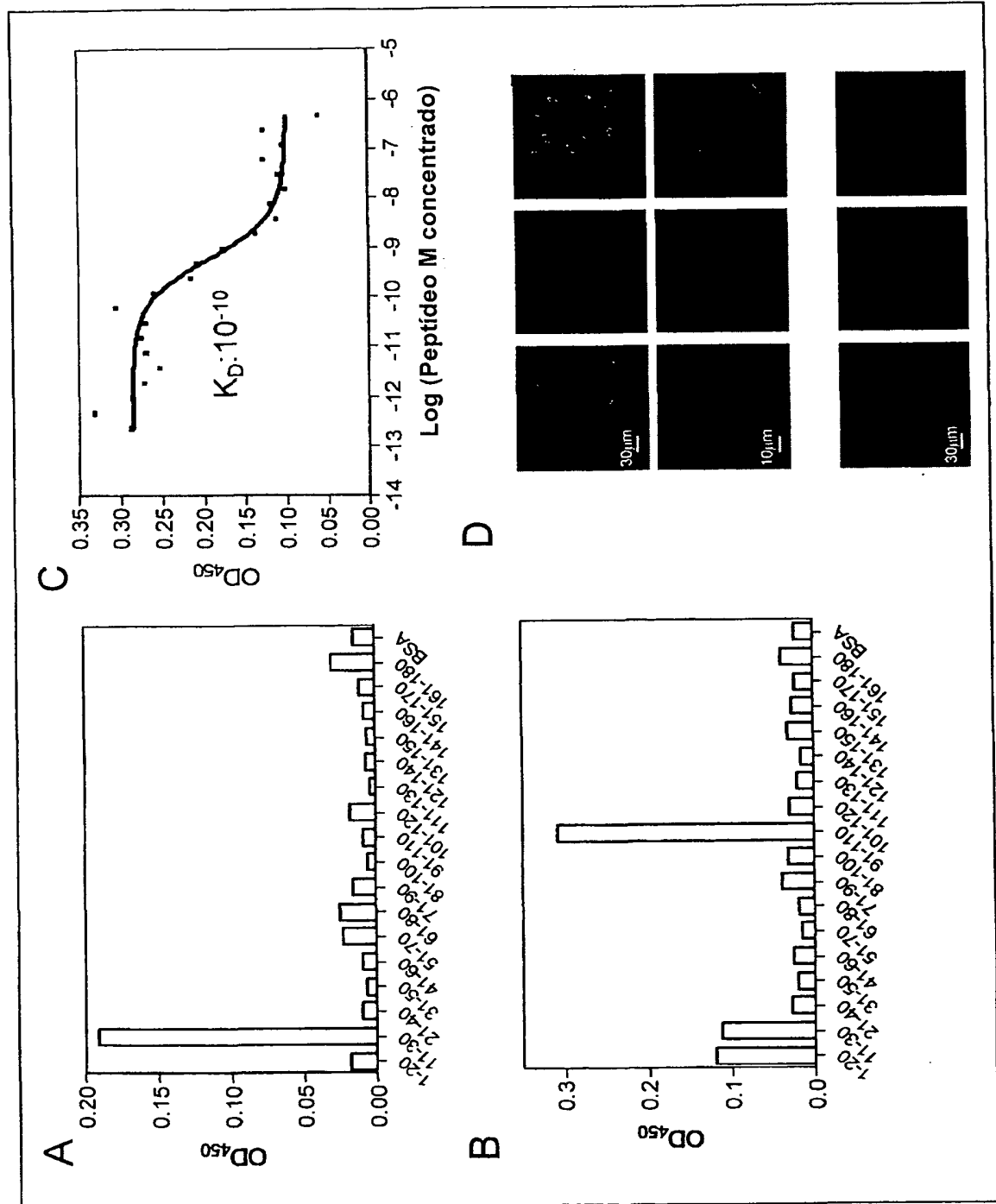


Fig. 2



12D7 VH Cadeia

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAASGFSFIDYGMSWVRQVPGKLEWVAGMNWSGDKKG
 -----FR3-----CDR3-----JH-----
 HAESVKGRFIIISRDNAKNTLYLEMSSLRVEDTALYFCARGEYSNRFDPRGRGTLVTVSS

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGCAGCCTCTGGATTGAGCTTTATTGATTATGGCATGAGTTGGGTCCGCCAAGTTCCAG
 GGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGCTGGCATGAATTGGAGCGGCGATAAAAAAGGTCATGCGGAG
 TCTGTGAAGGGCCGATTCATCATTTCCAGAGACAACGCCAAGAACACCCTGTATCTAGAAAT
 GAGCAGCCTAAGAGTCGAAGACACGGCCCTGTATTTTGTGCGAGAGGGGAGTATAGCAATC
 GGTTCGACCCCCGGGGCCGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

12D7 VkL Cadeia

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

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCCT
 CTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATTCAGTATGGAACACCTACTTGAATTGGTTTC
 AGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCACGGCGCCTAATTTATAAGGTCTCTTCTCGTGACCCTGGT
 GTCCCCGACAGATTCAGCGGCACTGGGTGAGGCACTGATTTACACTGGAAATCAGCAGGGT
 GGAGGCTGAGGATATTGGGGTTTACTACTGCATGCAAGGGACGCACTGGCCTCCGATTTTGT
 GCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Fig. 4