

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 103**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07723187 .6**

96 Fecha de presentación: **12.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1993596**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **Vacuna contra el cáncer**

30 Prioridad:

13.03.2006 EP 06447035

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

04.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

04.12.2012

73 Titular/es:

**NOVOVACS HOLDING B.V. (100.0%)
Oxfordlaan 70
6229 EV Maastricht , NL**

72 Inventor/es:

**VANDER BORGHT, ANN;
UMMELEN, MONIQUE IDA JOZEF;
RAMAEKERS, FRANCISCUS CHARLES
SERVATIUS;
VAN DEN EIJNDE, STEFAN MAARTEN;
BROERS, JOSEPH LEONARDUS VICTOR;
FALKENBERG, FRANK WALTER y
HAHNEL, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 392 103 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra el cáncer.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere generalmente al campo del diagnóstico, pronóstico, tratamiento y prevención del carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC). En particular, los aspectos de la invención se dirigen a métodos de diagnóstico, tratamiento y prevención de los cánceres de pulmón de células pequeñas. En la presente invención se proporcionan métodos para usar un ácido nucleico y/o una proteína, que se expresan diferencialmente en las células tumorales del SCLC, y anticuerpos inmunoespecíficos para la proteína, para tratar, diagnosticar y/o prevenir dichos cánceres.

15 **Antecedentes de la invención**

El cáncer se caracteriza principalmente por un aumento en el número de células anormales derivadas de un tejido normal dado, la invasión de los tejidos adyacentes por estas células anormales, y la diseminación, linfática o transmitida por la sangre, de las células malignas a ganglios linfáticos regionales y a sitios distantes (metástasis). Los datos clínicos y estudios de biología molecular indican que el cáncer es un proceso de múltiples etapas que comienza con cambios preneoplásicos menores, que pueden progresar a neoplasia bajo ciertas condiciones.

El crecimiento anormal de las células premalignas se ilustra mediante hiperplasia, metaplasia, o más particularmente, displasia (para revisión de tales afecciones del crecimiento anormal, ver Robbins & Angell, 1976, Basic Pathology, 2ª ed., WB Saunders Co., Philadelphia, pág. 68-79). La lesión neoplásica puede evolucionar clonalmente y desarrollar una capacidad creciente para el crecimiento, metástasis y heterogeneidad, especialmente bajo condiciones en que las células neoplásicas escapan de la vigilancia inmune del huésped (Roitt, I., Brostoff, J. y Kale, D., 1993, Immunology, 3ª ed., Mosby, St. Louis, págs. 17.1-17.12). La epidemiología del cáncer en los Estados Unidos se estima en más de 1,300,000 nuevos casos y más de 550,000 muertes (Jemal y otros, 2003, CA Cancer J. Clin., 53, 5-26) estimadas para 2003. El cáncer de pulmón es uno de los cánceres más comunes con un estimado de 172,000 nuevos casos proyectados para 2003 y 157,000 muertes en los Estados Unidos (Jemal y otros, 2003, CA Cancer J. Clin., 53, 5-26). Los carcinomas pulmonares típicamente se clasifican como carcinomas de pulmón de células pequeñas (SCLC) o carcinomas de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). El SCLC comprende aproximadamente 20% de todos los cánceres de pulmón con el NSCLC que comprende el resto de aproximadamente 80%. El NSCLC se divide adicionalmente en adenocarcinoma (AC) (aproximadamente 30-35% de todos los casos), el carcinoma de células escamosas (SCC) (aproximadamente 30% de todos los casos) y el carcinoma de células grandes (LCC) (aproximadamente 10% de todos los casos). Los subtipos adicionales del NSCLC, no tan claramente definidos en la literatura, incluyen el carcinoma de células adenoescamosas (ASCC), y el carcinoma broncoalveolar (BAC).

El cáncer de pulmón es la causa principal de muerte por cáncer en el mundo, y más específicamente el NSCLC representa aproximadamente 80% de todos los casos de enfermedad (Cancer Facts and Figures, 2002, American Cancer Society, Atlanta, pág. 11.). Hay cuatro tipos principales de NSCLC, que incluyen el adenocarcinoma, el carcinoma de células escamosas, el carcinoma broncoalveolar, y el carcinoma de células grandes. El adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas son los tipos más comunes de NSCLC basados en la morfología celular (Travis y otros, 1996, Lung Cancer Principles and Practice, Lippincott-Raven, Nueva York, págs. 361-395). Los adenocarcinomas se caracterizan por una localización más periférica en el pulmón y a menudo tienen una mutación en el oncogén K-ras (Gazdar y otros, 1994, Anticancer Res. 14:261-267). Los carcinomas de células escamosas están localizados típicamente más céntricos y con frecuencia portan mutaciones del gen p53 (Niklinska y otros, 2001, Folia Histochem. Cytobiol. 39:147-148).

El carcinoma de pulmón es el asesino número uno entre los pacientes con cáncer, para los que no existe un tratamiento adecuado, lo que corresponde a aproximadamente un quinto de todas las muertes por cáncer en Europa (IARC). La creciente carga sobre la población está probablemente mejor ilustrada a partir de los estudios recientes en los Estados Unidos, que muestran que entre 1960 y 1990, las muertes por cáncer de pulmón entre las mujeres aumentaron más de 400% en el período para superar las muertes por cáncer de mama.

En la actualidad no existen protocolos de tratamiento adecuados para los diferentes tipos de cáncer de pulmón. Con la terapia convencional, la supervivencia media para el subtipo del SCLC es de 15 meses para la enfermedad en estadio limitado y 9 meses para la enfermedad en estadio extenso, mientras que la supervivencia a largo plazo es muy baja.

Los principales obstáculos para el éxito del tratamiento y la erradicación del cáncer de pulmón son el diagnóstico tardío, el comportamiento altamente metastásico, la resistencia a la quimioterapia y la imposibilidad de eliminar

quirúrgicamente todas las células cancerosas. En principio, las vacunas contra el cáncer son un enfoque más prometedor para el tratamiento del cáncer en general y el cáncer de pulmón en particular. Los principales obstáculos en el desarrollo de una vacuna eficaz son la carencia de antígenos específicos del cáncer a los que dirigirse y la carencia de herramientas para evaluar la inmunoterapia basada en estos objetivos. Un problema adicional es la heterogeneidad del cáncer de pulmón anteriormente citada.

A diferencia de muchos otros tipos de cáncer, el tratamiento del cáncer de pulmón no ha resultado en mejoras significativas en las tasas de supervivencia durante las últimas décadas, que han mostrado una supervivencia total a 5 años de sólo 14% (Haura EB.2001, Cancer Control; 8: 326-336 (www.medscape.com/viewarticle/409059) \; Crawford J. (www.medscape.com/viewarticle/429347_1).

Hasta la fecha, la decisión sobre los protocolos de tratamiento está guiada especialmente por la subdivisión en SCLC y NSCLC. A diferencia de los otros tipos de cáncer de pulmón, el SCLC es sensible a la quimioterapia. En aproximadamente el 75% de los casos de SCLC se puede notar una respuesta inicial a la quimioterapia, con una respuesta clínica completa en aproximadamente 35% de todos los casos (Johnson DH, y otros, 1987; Am J Med Sci 293: 377-389). Desafortunadamente, sin embargo, en la mayoría de los casos se presenta una recaída, que resulta en una tasa de supervivencia a los tres años de sólo 5-10%, y una tasa de supervivencia a los cinco años de aproximadamente 1% (Minna JD, y otros, 1985, Cancer of the lung. In: Cancer. Principles and practice of oncology 2ª edición); Dentro del SCLC se puede hacer una subdivisión clínicamente relevante entre el SCLC clásico y la variante. La variante de tipo del SCLC parece ser aún menos sensible a la quimioterapia y la radioterapia. Como resultado, el tiempo de supervivencia medio de los pacientes que sufren del SCLC de tipo variante es significativamente más corto que el de aquellos con un tipo clásico del SCLC (Radice PA, y otros 1982, Cancer; 50: 2894-2902). Además para los pacientes con un SCLC combinado se observa un peor pronóstico que para los pacientes con el SCLC clásico (Hirsch FR y otros, 1983, Cancer; 52: 2144-2150). Aproximadamente 75% a 80% de los casos son de la histología NSCLC, y la mayoría de los pacientes se presentan ya sea con enfermedad localmente avanzada (etapa III) o enfermedad metastásica (etapa IV). Es importante que los pacientes sometidos a la resección quirúrgica curativa para la enfermedad localizada visible tengan tasas de supervivencia que se encuentran en el intervalo entre 50% y 80%, lo que implica la necesidad de un mejor tratamiento sistémico para curar la enfermedad micrometastásica oculta. En el NSCLC el tratamiento con quimioterapia es en general insatisfactorio (Minna JD, y otros 1985, Cancer of the lung. In: Cancer.Principles and practice of oncology, 2ª ed). Por lo tanto, con la excepción de las tasas de curación altas para el tratamiento quirúrgico de la enfermedad claramente localizada, el pronóstico para los pacientes con NSCLC es desalentador (Mulshine JL, y otros 1986., J Clin Oncol; 4: 1704-1715). En un pequeño subgrupo de pacientes se puede observar, sin embargo, una respuesta a la quimioterapia. En parte, estos casos podrían representar el NSCLC en los que se pueden encontrar componentes del SCLC ya que tal composición heterogénea es bastante común en el cáncer de pulmón (ver anteriormente). Puede ser obvio a partir de estos datos que modalidades alternativas de tratamiento para estos pacientes son críticas.

El principal objetivo de la presente invención es el desarrollo de un nuevo modelo para la biología y la antigenicidad del SCLC y desarrollar un nuevo concepto para una terapia de vacunación del SCLC. El enfoque estará dirigido hacia el descubrimiento de antígenos - objetivo específicos para el SCLC y las estrategias de inmunización.

Se han identificado miles de secuencias de ADNc que están posiblemente asociadas con el cáncer. Por ejemplo, en WO03047526 una secuencia de ADNc (la sec. con núm. de ident.: 72), similar a las secuencias de la presente invención, se sugiere que están próximas a marcadores genéticos que se muestran que se asocian sistemáticamente con marcadores de cáncer de pulmón. Un número de antígenos asociados a tumores se han identificado en cánceres de pulmón humano y se han usado como objetivos para vacunas contra el cáncer de pulmón en general. Estos incluyen el antígeno carcinoembrionario (CEA), la mucina epitelial humana MUC-1, el antígeno de cáncer de testículo NY-ESO-1, y el gangliósido GM1-Fuc (Haura EB. 2001, Cancer Control,8: 326-336; www.medscape.com/viewarticle/409059). La vacunación de los pacientes con tumores con células tumorales inactivadas se intentó décadas atrás sin mucho éxito. La inyección intratumoral de micobacterias muertas por calor en las lesiones del SCLC como un adyuvante con células tumorales autólogas ha llevado a cierto éxito.

El NSCLC puede evocar respuestas inmune antitumorales humorales y celulares específicas en algunos pacientes (Salgia R, y otros, 2003; J clin Oncol; 21:624-630). Las estrategias de clonación basadas en serología han identificado múltiples antígenos asociados a los tumores, que incluyen F4G, aldolasa, anexina XI, Rip 1-, y NY-12-LU. Las respuestas humorales a las células de cáncer de pulmón autólogas pueden estar asociadas con una supervivencia prolongada. Las estrategias de clonación basadas en las células T de manera similar han revelado diversos objetivos en el NSCLC, que incluyen Her2/neu, SART-1, SART-2, KIAA0156, ART-1, ART-4, ciclofilina B, factor de elongación 2 mutado, enzima málico, y alfa-actinina-4. El desarrollo de respuestas de linfocitos T citotóxicos al NSCLC además se puede correlacionar con la supervivencia prolongada.

En la práctica clínica, el diagnóstico preciso de varios subtipos de cáncer es importante porque las opciones de tratamiento, el pronóstico y la probabilidad de respuesta terapéutica varía ampliamente todo en dependencia del diagnóstico. El pronóstico exacto, o la determinación de la supervivencia libre de metástasis distantes podrían permitir a un oncólogo adaptar la administración de la quimioterapia adyuvante, con los pacientes que tienen un peor pronóstico a los que se da un tratamiento más agresivo. Además, la predicción exacta de mal pronóstico sería de gran impacto en los ensayos clínicos para las nuevas terapias contra el cáncer de pulmón, debido a que los posibles pacientes del estudio después se podrían estratificar de acuerdo con el pronóstico. Los ensayos se podrían limitar a los pacientes con mal pronóstico, lo que a su vez haría más fácil discernir si una terapia experimental es eficaz. Hasta la fecha, no se ha identificado ningún conjunto de predictores satisfactorios para el pronóstico basado en la información clínica solamente.

Por lo tanto sería beneficioso proporcionar métodos y reactivos específicos para el diagnóstico, estadificación, pronóstico, seguimiento y tratamiento del cáncer, que incluye el cáncer de pulmón. Además sería beneficioso proporcionar métodos que identifiquen individuos con una predisposición para la aparición de cáncer de pulmón y otros tipos de cáncer, y por lo tanto son sujetos adecuados para la terapia preventiva.

Sumario de la invención

Por medio del uso de métodos de expresión diferencial los presentes inventores identificaron y caracterizaron NCAM-180 y variantes de este, como un gen cuya expresión se asocia con el SCLC. Este descubrimiento por los presentes inventores ha hecho posible el uso de las moléculas NCAM-180 y variantes de estas para el tratamiento, prevención y diagnóstico del SCLC.

La NCAM-180 nueva tiene un patrón de expresión regulado de forma ascendente en los tejidos y las líneas celulares del SCLC que se muestran y describen. Además se muestra y se describe Exon18_MUM, un fragmento de NCAM-180 que retiene al menos una característica funcional del gen NCAM-180 de longitud completa, de tipo salvaje. Métodos de uso del gen, los productos de los genes, y los antagonistas o agonistas de los genes o de los productos de los genes (NCAM-180 y las variantes de este, el ADNc, el ARN y/o la proteína) como objetivos para el diagnóstico y la selección de fármacos y terapias para el SCLC además se muestran y se describen. Además se describe el uso de los genes o productos de los genes o derivados de estos como vacunas contra el SCLC. En una modalidad, se proporcionan métodos para el uso de una proteína NCAM-180 (tal como la sec. con núm. de ident.: 4), los fragmentos de esta, en particular Exon18_MUM (tal como la sec. con núm. de ident.: 2 y 6), y variantes de estas, o los ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas para el tratamiento, prevención y diagnóstico del SCLC. Se proporcionan secuencias de nucleótidos aisladas del ADNc del gen NCAM-180 o variantes de estas. Específicamente, las secuencias de ADNc aisladas de NCAM-180 humanas y los fragmentos Exon18_MUM de estas (la sec. con núm. de ident.: 1, 3 y 5) se proporcionan en la presente descripción. Además se proporcionan las secuencias de aminoácidos aisladas codificadas por la sec. con núm. de ident.: 1, 3 y 5 que se denotan sec. con núm. de ident.: 2, 4 y 6. La presente invención se refiere además a métodos para la evaluación diagnóstica y el pronóstico del SCLC en un sujeto animal. Preferentemente, el sujeto es un mamífero, con mayor preferencia el sujeto es un humano. En una modalidad preferida, la invención se refiere a métodos para la evaluación diagnóstica y el pronóstico del SCLC. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden usar como sondas de hibridación diagnósticas o como cebadores para el análisis de PCR diagnóstico para la detección de la expresión anormal de un gen NCAM-180.

Los anticuerpos u otras parejas de unión a NCAM-180 o variantes de estas se pueden usar en una prueba de diagnóstico para detectar la presencia de un producto NCAM-180 en fluidos corporales, células o en tejido de biopsia. En modalidades específicas, la medición de NCAM-180 y variantes de esta en suero o celular se pueden hacer para detectar o clasificar el SCLC.

Además, se presentan los métodos para el tratamiento del SCLC. Tales métodos comprenden la administración de composiciones que son capaces de modular el nivel de NCAM-180 y variantes de este, que incluyen la modulación de la expresión del gen NCAM-180 y/o el nivel de actividad del producto del gen NCAM-180 en un sujeto. El sujeto puede ser cualquier animal, preferentemente un mamífero, con mayor preferencia un humano.

La invención además proporciona métodos para prevenir el SCLC en donde NCAM-180 o variantes de este, en particular Exon18_MUM o fragmentos de este que son capaces de inducir una respuesta inmune humoral o celular en un mamífero, se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmune en el sujeto. Los fragmentos Exon18_MUM se caracterizan además porque comprenden de 5 a 30 aminoácidos, en particular de 9 a 15 aminoácidos y comprenden un epítipo seleccionado de PAASNLSSSVLAN (AA101-113 de la sec. con núm. de ident.: 2), VLSPSAPAGVG (AA 117-127 de la sec. con núm. de ident.: 2), LAAAAAPATEAPQ (AA 153-165 de la sec. con núm. de ident.: 2), KGPDPPEPTQPGA (AA 174-185 de la sec. con núm. de ident.: 2) y DFKMDEGNFK (AA 216-225 de la sec. con núm. de ident.: 2).

- El sujeto puede ser cualquier animal, preferentemente un mamífero, con mayor preferencia un humano. La invención además proporciona métodos para tratar o prevenir el SCLC mediante la administración de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína NCAM-180 o una variante, en particular que codifica para Exon18_MUM o fragmentos de este que son capaces de inducir una respuesta inmune humoral o celular en un mamífero, del mismo a un sujeto de tal manera que la expresión de la proteína NCAM-180 o la variante resultan en la producción de estos polipéptidos en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmune. La respuesta inmune puede ser humoral, celular o una combinación de ambas. En una modalidad preferida, la invención proporciona un método de inmunización para conferir protección contra la aparición del SCLC.
- La invención proporciona además métodos para tratar el SCLC al proporcionar cantidades terapéuticas de una molécula de ácido nucleico antisentido. Una molécula antisentido es una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la totalidad o una parte de una secuencia del gen NCAM-180 y que, por lo tanto, puede hibridar con el gen NCAM-180 y variantes de este, en particular a Exon18_MUM, un fragmento de NCAM-180. Por consiguiente, la hibridación de la molécula anti-sentido puede reducir o inhibir la expresión de NCAM-180. En una modalidad preferida, el método se usa para tratar el SCLC.
- La invención incluye además un estuche para evaluar si un paciente está afectado con SCLC. Este estuche comprende reactivos para evaluar los niveles de expresión de NCAM-180 o una variante, que incluye fragmentos de este tales como Exon18_MUM o fragmentos de este que son capaces de inducir una respuesta inmune humoral o celular en un mamífero. En otro aspecto, el estuche comprende un anticuerpo, en donde el anticuerpo se une específicamente con una proteína correspondiente a NCAM-180 y variantes de esta, en particular, Exon18_MUM o fragmentos de este que son capaces de inducir una respuesta inmune humoral o celular en un mamífero. El estuche puede comprender además una pluralidad de anticuerpos, en donde la pluralidad se une específicamente con epítomos diferentes de una NCAM-180 y variantes de esta, en particular con fragmentos Exon18_MUM que comprenden de 5 a 30 aminoácidos, en particular de 9 a 15 aminoácidos y comprende un epítomo seleccionado de PAASNLSSSVLAN (AA101-113 de la sec. con núm. de ident.: 2), VLSPSAPAGVG (AA 117-127 de la sec. con núm. de ident.: 2), LAAAAAPATEAPQ (AA 153-165 de la sec. con núm. de ident.: 2), KGPDPPEPTQPGA (AA 174-185 de la sec. con núm. de ident.: 2) y DFKMDEGNFK (AA 216-225 de la sec. con núm. de ident.: 2).
- En una modalidad alternativa, el estuche comprende una sonda de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótido). La sonda se une específicamente a un polinucleótido transcrito correspondiente a un producto del gen NCAM-180 y variantes de este. El estuche puede comprender además una pluralidad de sondas, en donde cada una de las sondas se une específicamente a un polinucleótido transcrito correspondiente a una región diferente de la secuencia de ARNm transcrito a partir del gen NCAM-180 y variantes de este, en particular, a la secuencia de ácido nucleico de codificación para Exon18_MUM, un fragmento de NCAM-180. En una modalidad más particular las sondas consisten esencialmente de 15 a 50, 18 a 35, 15 a 24, 18 a 30, 18 a 21 o 21 a 24 nucleótidos de una secuencia que codifica un polipéptido de la invención o su complemento. En una modalidad adicional, los estuches para uso diagnóstico, incluyen los cebadores para el uso en la PCR que puedan amplificar un ADNc de NCAM-180 y variantes de este, que incluye el correspondiente ADNc y/o los genes y se proporciona además una cantidad estándar del ADNc de NCAM-180.
- Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para diagnosticar el SCLC en un sujeto, que comprende detectar o medir un producto de NCAM-180 o una variante de este que incluye fragmentos de este, tales como Exon18_MUM, en una muestra derivada de dicho sujeto, en donde dicho producto de NCAM-180 es (a) un ARN correspondiente a una de las sec. con núms. de ident.: 1, 3 ó 5, o un ácido nucleico derivado de este, (b) una proteína que comprende una de las sec. con núms. de ident.: 2, 4 ó 6, en la cual los niveles elevados de un producto de NCAM-180 y variantes de este, en comparación con una muestra de no SCLC o un valor estándar predeterminado para una muestra no cancerosa, indica la presencia de un SCLC en el sujeto.
- En una modalidad del método de diagnóstico anterior, el sujeto es un humano. En aún otras modalidades, la muestra es una muestra de tejido, una pluralidad de células, o un fluido corporal. La presente invención proporciona además métodos para el tratamiento del SCLC en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad de un compuesto que reduce el nivel y/o antagoniza la actividad de un producto de NCAM-180 y las variantes de este, que incluyen fragmentos tales como Exon18_MUM y otros como se definió en la presente descripción anteriormente, en donde dicho producto de NCAM-180 es (a) un ARN correspondiente a una de las sec. con núms. de ident.: 1 ó 5, o un ácido nucleico derivado de este, (b) una proteína que comprende una de las sec. con núms. de ident.: 2 ó 6. En una modalidad, un producto del gen cuya expresión se disminuye es una proteína codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido con al menos 90% de identidad de secuencia a una de las sec. con núms. de ident.: 1, 3 ó 5. En otra modalidad, el compuesto disminuye la expresión de un RNA correspondiente a una de las sec. con núms. de ident.: 1, 3 ó 5. El antagonista puede ser (i) una proteína, (ii) un péptido, (iii) una molécula orgánica con un peso molecular menor de 2000 daltons, (iv) una molécula inorgánica con un peso molecular menor de 2000 daltons, (v) una molécula de oligonucleótido antisentido que se une a dicho ARN e inhibe la traducción de dicho ARN; (vi) una molécula de ribozima que dirige dicho ARN e inhibe la traducción de

dicho ARN; (vii) un anticuerpo que específicamente o selectivamente se une a un producto NCAM-180 y las variantes de este como se define en la presente descripción, (viii) un oligonucleótido de hebra doble que forma una triple hélice con un promotor de un gen NCAM-180 y variantes de este, en donde dicho gen NCAM-180 es un ácido nucleico al menos 80% homólogo a una de las sec. con núms. de ident.: 1, 3 ó 5, o un complemento de estas como se determina por medio del uso del algoritmo NBLAST; o (ix) un oligonucleótido de hebra doble que forma una triple hélice con un promotor de un gen L, en donde dicho gen NCAM-180 es un ácido nucleico al menos 80% homólogo a una de las sec. con núms. de ident.: 1, 3 ó 5, o un complemento de estas como se determina por medio del uso del algoritmo NBLAST. En donde el compuesto es un anticuerpo antagonista de NCAM-180, el anticuerpo se une inmuno-específicamente a una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de una de las sec. con núms. de ident.: 2, 4 ó 6 y de ese modo reduce o inhibe una actividad de una proteína de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona adicionalmente una formulación vacunal para prevenir o retrasar la aparición del SCLC que comprende (i) una cantidad inmunogénica del producto de NCAM-180, en donde dicho producto de NCAM-180 es: (a) un ARN correspondiente a una de las sec. con núms. de ident.: 1 ó 5, o un ácido nucleico derivado de este, (b) una proteína que comprende una de las sec. con núms. de ident.: 2 ó 6 o un fragmento de una de las sec. con núms. de ident.: 2 ó 6, en donde dicho fragmento es capaz de inducir una respuesta humoral o celular en un mamífero, en particular una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) en un mamífero. En una modalidad particular el fragmento capaz de inducir una respuesta humoral o celular en un mamífero comprende de 5 a 30 aminoácidos de cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 2, 4 ó 6, en particular a partir de 9 a 15 aminoácidos y comprende un epítipo seleccionado de PAASNLSSSVLAN (AA101-113 de la sec. con núm. de ident.: 2), VLSPSAPAGVG (AA 117-127 de la sec. con núm. de ident.: 2), LAAAAAPATEAPQ (AA 153-165 de la sec. con núm. de ident.: 2), KGPDPPEPTQPGA (AA 174-185 de la sec. con núm. de ident.: 2) y DFKMDEGNFK (AA 216-225 de la sec. con núm. de ident.: 2).

Estos y otros aspectos de la invención se describen en la presente descripción con más detalle.

Descripción de las secuencias

La sec. con núm. de ident.: 1 es la secuencia de nucleótido para Exon18_MUM humano.
 La sec. con núm. de ident.: 2 es la secuencia de aminoácido para Exon18_MUM humano.
 La sec. con núm. de ident.: 3 es la secuencia de nucleótido para NCAM-180 humana.
 la sec. con núm. de ident.: 4 es la secuencia de aminoácido para NCAM-180 humana.
 la sec. con núm. de ident.:5 es la secuencia de nucleótido para un fragmento Exon18_MUM humano.
 La sec. con núm. de ident.: 6 es la secuencia de aminoácido para el fragmento Exon18_MUM humano codificado por la sec. con núm. de ident.:5.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Representación esquemática del principio de expresión diferencial de la PCR. Para el conjunto de cebadores A, el cebador directo se diseñó en el exón 17, el cebador inverso en el exón 19. Para el conjunto de cebadores B, el cebador directo, así como el inverso se diseñaron en el Exon18_MUM. La amplificación por PCR de las células que expresan NCAM-140 dio como resultado un producto de PCR de 180 pb con el conjunto de cebadores A, y ningún amplicón con el conjunto de cebadores B. Las células que expresan NCAM-180 producen un amplicón de PCR de 600 pb con el conjunto de cebadores B. Las células que expresan tanto NCAM-140 y NCAM-180 producen productos de PCR con ambos conjuntos de cebadores.

Figura 2 Sobreexpresión de Exon18_MUM como parte de NCAM-180 en cultivos de células derivadas de las líneas celulares derivadas de tumores neuroendocrinos (SH-Sysy y CCI) y en las líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón de células pequeñas (H69, H82, GLC-1, GLC1-M13). Las células que expresan Exon18_MUM, dan como resultado un producto de PCR de 604 pb en la PCR específica de MUM. Las células que expresan la variante de empalme de la NCAM-140, tienen un producto de 180 pb para el exón 17-19 de la reacción de PCR de amplificación. La expresión alta está marcada como (++), la expresión media (+), la expresión baja (-+) y la expresión no detectable (-).

Figura 3: Proteína His-NCAM-Exon18_MUM purificada, truncada (panel A) y de longitud completa (panel B), producida en *E Coli* y purificada en columnas de quelato de Ni.

Figura 4: Respuesta de CTL medida después de la re-estimulación in vitro con una mezcla de péptidos Exon18_MUM de 9-mero de superposición. Los ratones se inmunizaron con la proteína y/o el ADN de Exon18_MUM. Los bazo se aislaron, las células de bazo se cosecharon y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos. Posteriormente, se realizó la re-estimulación in vitro con una mezcla de péptidos Exon18_MUM de 9-mero de superposición. El número de células secretoras de IFN- γ por 10^5 células T CD8 + se midió por medio del uso de la citometría de flujo. PPI = péptido irrelevante = re-estimulación realizada con péptidos no relacionados con la

región Exon18_MUM de la proteína NCAM. Para cada grupo la inmunización se realizó dos veces. Los reactivos usados para inducir están representados antes de /, los reactivos usados para reforzar están representados después de /. El adyuvante usado es Abisco-100.

- 5 A: PBS/PBS
 B: adyuvante/adyuvante
 C: proteína Exon18_MUM en adyuvante/ proteína Exon18_MUM en adyuvante
 D: proteína Exon18_MUM/proteína Exon18_MUM
 10 E: vector pCI vacío / vector pCI vacío
 F: pCI Exon18_MUM/ pCI Exon18_MUM
 G: pCI Exon18_MUM/ proteína Exon18_MUM en adyuvante

15 **Figura 5:** Se midieron las respuestas de células T citotóxicas en los ratones inmunizados con la proteína Exon18_MUM. Las células de bazo de ratón se re-estimularon *in vitro* con péptidos de 9-mer individuales. El número de células T CD8 positivas que contenían IFN- γ intracelular se midió por medio del uso de una lectura basada en FACS.

20 **Figura 6: A** Se midieron las respuestas de células T citotóxicas en los ratones inmunizados con el ADN Exon18_MUM. Las células de bazo de ratón se re-estimularon *in vitro* con péptidos de 9-mer individuales. El número de células T CD8 positivas que contenían IFN- γ intracelular se midió por medio del uso de una lectura basada en FACS. **B** la puntuación prevista del haplotipo H-2^{db}.

25 **Figura 7: Respuesta humoral, medida mediante el ELISA de la proteína Exon18_MUM de NCAM.** Los ratones se inmunizaron con la proteína Exon18_MUM truncada y/o el ADN de Exon18_MUM truncado. Los ratones se sangraron, el suero se aisló y se diluyó 1/200 con amortiguador. Las placas de ELISA se recubrieron con la proteína Exon18_MUM, y la detección del anticuerpo unido se realizó por medio del uso de un anti-IgG de ratón conjugado con HRP. La DO se midió a 450 nm.

30 **Figura 8: Respuesta humoral, medida mediante el ELISA de la proteína Exon18_MUM de NCAM.** Los ratones se inmunizaron con la proteína Exon18_MUM truncada. Los ratones (50 en total, 5 en cada grupo) se sangraron, el suero se aisló y se diluyó con amortiguador (el intervalo 1/50-1/135.000). Las placas de ELISA Se recubrieron respectivamente con la proteína Exon18_MUM de longitud completa, **A** y la proteína Exon18_MUM truncada, **B**. La detección del anticuerpo unido se realizó por medio del uso de un anti-IgG de ratón conjugado con HRP. La DO se midió a 450 nm.

35 **Figura 9:** Microscopía de fluorescencia de las células HCT-116 (NCAM-negativas), H82 (NCAM Exon18_MUM positivas) y H69 (NCAM Exon18_MUM positivas) teñidas con el anticuerpo monoclonal (IgM) producido por el hibridoma MUM, MUMI 21 B2. El anticuerpo secundario de cabra anti- cadena μ de ratón marcado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen) se usó como anticuerpo secundario para la detección de la unión del anticuerpo.

40 **Figura 10:** Imagen de microscopía confocal de las células H69 que expresan el NCAM Exon18_MUM, teñidas con el anticuerpo monoclonal (IgM) producido por el hibridoma MUM, MUMI 21 B2 en una dilución de 1/2000. El anticuerpo secundario de cabra anti- cadena μ de ratón marcado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen) se usó como anticuerpo secundario para la detección de la unión del anticuerpo.

45 Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se exponen para aclarar los aspectos de la invención: Específico o selectivo: un ácido nucleico usado en una reacción, tal como una sonda usada en una reacción de hibridación, un cebador usado en una PCR, o un ácido nucleico presente en una preparación farmacéutica, se refiere como "selectivo" si hibrida o reacciona con el objetivo previsto con mayor frecuencia, más rápidamente o con una mayor duración de lo que lo hace con sustancias alternativas. De manera similar, un polipéptido se refiere como "selectivo" si se une a un objetivo previsto, tal como un ligando, hapteno, sustrato, anticuerpo, u otro polipéptido con mayor frecuencia, más rápidamente o con una mayor duración de lo que lo hace con sustancias alternativas. Un anticuerpo se refiere como "selectivo" si se une a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno al objetivo previsto, con mayor frecuencia, más rápidamente o con una mayor duración de lo que lo hace con sustancias alternativas. Un marcador es selectivo para un tipo particular de célula o tejido si se expresa predominantemente en o sobre ese tipo de célula o tejido, particularmente con respecto a una muestra biológica de interés.

60 **VARIANTE (S):** Una variante (v) de polinucleótidos o polipéptidos, como se usa el término en la presente descripción, son polinucleótidos o polipéptidos que son diferentes de un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente. Los polinucleótidos variantes se limitan generalmente a fin de que la secuencia de nucleótidos de referencia y la variante estén estrechamente relacionadas en general y, en muchas regiones, idénticas. Los cambios

en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden ser silenciosos. Es decir, pueden no alterar la secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido. Cuando las alteraciones se limitan a cambios silenciosos de este tipo una variante codificará un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que la referencia. Alternativamente, los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Tales cambios de nucleótidos pueden resultar en sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia. Los polipéptidos variantes se limitan generalmente a fin de que las secuencias de referencia y la variante sean muy similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Por ejemplo, una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia en una o más sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos, que pueden estar presentes o ausentes en cualquier combinación.

CORRESPONDEN O CORRESPONDIENTES: Entre los ácidos nucleicos, "correspondiente" significa homóloga o complementaria a una secuencia o porción particular de la secuencia de un ácido nucleico. Como entre ácidos nucleicos y polipéptidos, "correspondiente" se refiere a los aminoácidos de un péptido en un orden derivado a partir de la secuencia o porción de la secuencia de un ácido nucleico o su complemento. Como entre los polipéptidos (o péptidos y polipéptidos), "correspondiente" se refiere a los aminoácidos de un primer polipéptido (o péptido) en un orden derivado a partir de la secuencia o porción de la secuencia de un segundo polipéptido.

GEN NCAM-180: Como se usa en la presente descripción, a menos que se indique lo contrario, se refiere a la nueva variante de empalme NCAM descubierta en la presente descripción para regularse de manera ascendente en el SCLC y subconjuntos de este.

PRODUCTO DE NCAM-180 O PRODUCTO DEL GEN NCAM-180: Como se usa en la presente descripción, a menos que se indique lo contrario, un producto de NCAM-180 es: un ARN correspondiente a una de las sec. con núms. de ident.: 1, 3 ó 5, o un ácido nucleico derivado de la misma; una proteína que comprende una de las sec. con núms. de ident.: 2, 4 ó 6. En incluso una modalidad adicional, un fragmento de dicho NCAM-180 o Exon18_MUM se caracteriza en que comprende de 5 a 30 aminoácidos, más en particular a partir de 9 a 15 aminoácidos y comprende un epítipo seleccionado de PAASNLSVVLAN (AA101-113 de la sec. con núm. de ident.: 2), VLSPSAPAGVG (AA 117-127 de la sec. con núm. de ident.: 2), LAAAAAPATEAPQ (AA 153-165 de la sec. con núm. de ident.: 2), KGPDPPTQPGA (AA 174-185 de la sec. con núm. de ident.: 2) y DFKMDEGNFK (AA 216-225 de la sec. con núm. de ident.: 2).

ELEMENTOS DE CONTROL: Como se usa en la presente descripción, se refiere colectivamente a las regiones promotoras, las señales de poliadenilación, las secuencias de terminación de la transcripción, los dominios reguladores corriente arriba, los orígenes de replicación, los sitios internos de entrada de ribosomas ("IRES"), los potenciadores, y similares, que proporcionan colectivamente para la replicación, la transcripción y la traducción de una secuencia de codificación en una célula receptora. No todos estos elementos de control se requieren mientras la secuencia de codificación seleccionada es capaz de replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped adecuada.

REGIÓN PROMOTORA: se usa en la presente descripción en su sentido corriente para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en donde la secuencia reguladora se deriva a partir de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia de codificación corriente abajo (dirección 3 '-).

UNIDO OPERATIVAMENTE: Como se usa en la presente descripción, se refiere a una disposición de elementos en los que los componentes así descritos están configurados de modo que realizan su función usual. De este modo, los elementos de control unidos operativamente a una secuencia de codificación son capaces de efectuar la expresión de la secuencia de codificación. Los elementos de control no necesitan ser contiguos a la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir la expresión de esta. Exógenos: Como se usa en la presente descripción, el término exógeno se refiere a lo que se deriva o se originó externamente. Cuando se usa en el contexto de la expresión exógena de un gen o proteína, el término se refiere a un gen o proteína que se expresa en una célula o tejido que normalmente no expresan el gen o proteína. Cuando se usa en el contexto de secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, el término puede usarse además para referirse a una asociación de dos o más secuencias de ácido nucleico que se han unido operativamente, pero no están normalmente unidas operativamente en un estado nativo.

TRATAR UN CÁNCER O UN TUMOR: Como se usa en la presente descripción, la frase "tratar un cáncer o un tumor" o "tratamiento de un cáncer o un tumor" en un mamífero significa uno o más de aliviar un síntoma de, corregir un trastorno molecular o fisiológico subyacente, o reducir la frecuencia o gravedad de una consecuencia fisiológica patológica o perjudicial de un cáncer o un tumor en un mamífero. A modo de ejemplo, y no como limitación, las consecuencias fisiológicas perjudiciales de un cáncer o un tumor puede incluir la proliferación incontrolada, la metástasis y la invasión de otros tejidos, y la supresión de una respuesta inmune.

INMUNOLÓGICAMENTE ESPECÍFICO: Con respecto a los anticuerpos de la invención, el término "inmunológicamente específico" se refiere a los anticuerpos que se unen a uno o más epítomos de una proteína de interés (por ejemplo, la proteína Exon18_MUM), pero que sustancialmente no reconocen y se unen a otras moléculas en una muestra que contiene una población de moléculas biológicas antigénicas mezcladas.

5 QUE CONSISTE ESENCIALMENTE EN: La frase "consiste esencialmente en" cuando se refiere a un nucleótido o aminoácido particular significa una secuencia que tiene las propiedades de una sec. con núm. de ident. dado. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a una secuencia de aminoácido, la frase incluye la secuencia per se y las modificaciones moleculares que no afectarían las características básicas y nuevas de la secuencia. Tal secuencia de aminoácidos exhibe 80% de homología de secuencia o mayor, es decir, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más con la de la sec. con núm. de ident. dada. En particular, dicha secuencia de aminoácidos exhibe 80% de identidad de secuencia o mayor, es decir, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o más con la de la sec. con núm. de ident. dada.

10 ANTAGONISTA: Como se usa en la presente descripción, un compuesto capaz de reducir el nivel y/o la actividad de NCAM-180 o una variante de esta se puede referir en la presente descripción como un antagonista de NCAM-180.

15 AGONISTA: Como se usa en la presente descripción, un compuesto capaz de aumentar el nivel y/o la actividad de NCAM-180 o una variante de esta se puede referir en la presente descripción como un agonista de NCAM-180.

ACTIVIDAD DE NCAM-180: Como se usa en la presente descripción, los términos "la actividad de NCAM-180", "la actividad del producto de NCAM-180", o "la actividad mediada por NCAM-180" se refieren a una actividad asociada con la expresión de NCAM-180 y/o un producto de NCAM-180. Tales actividades incluyen, pero sin limitarse a cambios en la proliferación celular, la motilidad celular, la diferenciación celular, y/o la adhesión celular asociada con cambios en los niveles de expresión NCAM-180. Como se usa en la presente descripción, los términos "elevado", "sobre-expresado", "regulado de forma ascendente", o "aumentado" se refieren a un aumento de aproximadamente dos veces o más en la expresión del transcrito y/o proteína NCAM-180 en comparación con la de un tejido de control, que expresa un nivel basal de NCAM-180.

20

25

Ácido nucleico

30 El ácido nucleico tal como se usa en los métodos de la presente invención incluye ADN (que incluye tanto el genómico como el ADNc) y ARN. Donde el ácido nucleico de acuerdo con la invención incluye ARN, la referencia a las secuencias que se muestran en los listados adjuntos se debe interpretar como referencia al ARN equivalente, con U sustituido por T.

35 El ácido nucleico de la invención puede ser de hebra simple o doble. Los ácidos nucleicos de hebra simple de la invención incluyen los ácidos nucleicos anti-sentido. De este modo, se entiende que la referencia a la sec. con núm. de ident.: 1 o secuencias que comprenden la sec. con núm. de ident.: 1 o los fragmentos de estas incluyen las secuencias complementarias a menos que el contexto sea claramente lo contrario. Lo mismo se aplica a la sec. con núm. de ident.: 3 ó 5.

40 Generalmente, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se proporciona como un aislado, en forma aislada y/o purificada, o libre o sustancialmente libre del material con el que se asocia de forma natural, tal como libre o sustancialmente libre del ácido nucleico que flanquea el gen en el genoma humano, excepto posiblemente una o más secuencia(s) reguladora para la expresión. El ácido nucleico puede ser total o parcialmente sintético y puede incluir ADN genómico, ADNc o ARN.

45

La invención además proporciona ácidos nucleicos que son fragmentos de los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención. En un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos cebadores o sondas que consisten esencialmente en, a partir de 15 a 50, por ejemplo a partir de 15 a 35, 18 a 35, 15 a 24, 18 a 30, 18 a 21 ó 21 a 24 nucleótidos de una secuencia que codifica un polipéptido de la invención o su complemento.

50

El término "consiste esencialmente en" se refiere a los ácidos nucleicos que no incluyen ninguna secuencia de ácido nucleico 5' o 3' adicional. En un aspecto adicional de la invención, los ácidos nucleicos de la invención que consisten esencialmente en, a partir de 15 a 30 nucleótidos tal como se definió anteriormente sin embargo puede estar unido en el extremo 3', pero preferentemente 5' a secuencias adicionales cortas (por ejemplo, a partir de 4 a 15, tal como a partir de 4 a 10 nucleótidos) a las que no están unidas de forma natural. Dichas secuencias adicionales son preferentemente enlazadores que comprenden un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para facilitar la clonación cuando el ácido nucleico de la invención se usa por ejemplo como un cebador de la PCR.

55

Los cebadores y sondas de la invención son deseablemente capaces de hibridar selectivamente a los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención. Por "selectivo", se entiende selectivo con respecto a las secuencias que codifican otros receptores de purinas y en particular con respecto a otros receptores aparte de los receptores de adenina. La capacidad de la secuencia para hibridar selectivamente se puede determinar por experimentación o calcular.

60

Por ejemplo, una manera de calcular la T_m de un cebador es mediante la referencia a la fórmula para calcular la T_m de los cebadores a una secuencia objetivo homóloga. Esta fórmula es $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(\text{A} + \text{T}) + 4(\text{G} + \text{C}) - 5$. Esto proporcionará la T_m bajo condiciones de $3 \times \text{SSC}$ y $0,1\%$ de SDS (donde SSC es NaCl $0,15 \text{ M}$, citrato de sodio $0,015 \text{ M}$, pH 7). Esta fórmula es generalmente adecuada para cebadores de hasta aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En la presente invención, esta fórmula se puede usar como un algoritmo para calcular una T_m nominal de un cebador para una secuencia específica derivada a partir de una secuencia que codifica un polipéptido de la invención. La T_m se puede comparar con una T_m calculada para secuencias de GPCR de humanos y ratas, basados en el número máximo de ajustes a cualquier parte de estas otras secuencias.

Las condiciones adecuadas para un cebador hibridar con una secuencia objetivo además se pueden medir experimentalmente. Las condiciones experimentales adecuadas comprenden hibridar un cebador candidato tanto al ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención como al ácido nucleico que codifica otros receptores de adenina en un soporte sólido bajo condiciones de hibridación de baja astringencia (por ejemplo $6 \times \text{SSC}$ a 55°C), el lavado en SSC reducido y/o la temperatura más alta, por ejemplo a $0,2 \times \text{SSC}$ a 45°C , y aumentar gradualmente la temperatura de hibridación para determinar las condiciones de hibridación que permiten al cebador hibridar con el ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, pero no a otros ácidos nucleicos de codificación del receptor de purina.

Los ácidos nucleicos de la invención, particularmente las sondas, pueden portar una marca reveladora. Las marcas adecuadas incluyen los radioisótopos tales como ^{32}P o ^{35}S , las marcas fluorescentes, las marcas enzimáticas, u otras marcas de proteínas tales como las biotina. Tales marcas se pueden añadir a polinucleótidos o cebadores de la invención y se pueden detectar por medio del uso de técnicas conocidas per se.

Los cebadores de la presente invención pueden comprender ácidos nucleicos sintéticos, tales como aquellos con estructuras del esqueleto modificadas que pretenden mejorar la estabilidad del ácido nucleico en una célula. Un número de tipos diferentes de modificación de oligonucleótidos se conocen en la materia. Estos incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato, la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, se debe entender que los polinucleótidos descritos en la presente descripción se pueden modificar por cualquier método disponible en la materia. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de mejorar la actividad in vivo o la vida útil de los polinucleótidos de la invención.

Además se incluyen dentro del alcance de la invención las secuencias antisentido basadas en las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente descripción, preferentemente en forma de oligonucleótidos, particularmente oligonucleótidos, o ribozimas estabilizadas.

Los oligonucleótidos antisentido se pueden diseñar para hibridar con la secuencia complementaria de ácido nucleico, el pre-ARNm o el ARNm maduro, lo que interfiere con la producción del polipéptido codificado por una secuencia de ADN objetivo dada, de modo que su expresión se reduce o se previene totalmente. Las ribozimas se diseñarán para escindir el ARNm codificado por una secuencia de ácido nucleico de codificación de NCAM-180 de la invención, deseablemente a una secuencia objetivo específica para los productos del gen NCAM-180 como se definió en la presente descripción anteriormente, se incluyen las secuencias de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1, 3 ó 5. La construcción de las secuencias antisentido y su uso se describe en Peyman y Ulman, *Chemical Reviews*, 90:543-584, (1990), Crooke, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 32:329-376, (1992), y Zamecnik y Stephenson, *P.N.A.S.*, 75:280-284, (1974). La construcción de las ribozimas y su uso se describe en, por ejemplo, Gibson y Shillito, *Molecular Biotechnology* 7 (2): 125-137, (1997).

La secuencia de ADNc de NCAM-180 de la invención se puede clonar por medio del uso de las técnicas de clonación por PCR estándar (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implica hacer un par de cebadores a los extremos 5' y 3' en las hebras opuestas de la sec. con núm. de ident.: 1, poner los cebadores en contacto con el ARNm o el ADNc obtenido de una célula de mamífero, realizar una reacción en cadena de la polimerasa bajo condiciones que provocan la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (por ejemplo mediante la purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores se pueden diseñar para contener los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción adecuadas de manera que el ADN amplificado se puede clonar en un vector de clonación adecuado. Lo mismo se aplica a la sec. con núm. de ident.: 3 ó 5.

Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a la sec. con núm. de ident.: 1, 3 ó 5 pero que codifican cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 2, 4 ó 6 u otros polipéptidos de la invención se puede conseguir en un número de maneras.

Por ejemplo, se puede realizar la mutagénesis dirigida de la sec. con núm. de ident.: 1, 3 ó 5. Esto es útil cuando, por ejemplo las secuencias requieren cambios de codones silenciosos para optimizar las preferencias de codón para

una célula huésped particular en la que se expresan las secuencias de polinucleótidos. Se pueden desear otros cambios de secuencia con el fin de introducir los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos. Se pueden desear cambios adicionales para representar cambios de codificación particulares que se requieren para proporcionar, por ejemplo, sustituciones conservadoras.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender secuencias adicionales en el extremo 5' o 3'. Por ejemplo, las secuencias líder 5', sintéticas o naturales, pueden estar unidas al ácido nucleico de codificación de los polipéptidos de la invención. Las secuencias adicionales además pueden incluir regiones no traducidas 5' o 3' requeridas para la transcripción del ácido nucleico de la invención en las células huéspedes particulares.

Además, en otro animal, particularmente los mamíferos (por ejemplo, el mono o los conejos), más particularmente los primates que incluyen el mono, los homólogos de NCAM-180 se pueden obtener y usar en los métodos de la presente invención. Tales secuencias se pueden obtener mediante la elaboración o la obtención de genotecas de ADNc hechas a partir de células en división o tejidos o genotecas de ADN genómico de otras especies animales, y sondear tales genotecas con sondas que comprenden toda o parte de la sec. con núm. de ident.: 1, 3 ó 5 bajo condiciones de media a alta astringencia (por ejemplo cloruro de sodio 0,03 M y citrato de sodio 0,03 M a partir de aproximadamente 50^NC a aproximadamente 60^NC).

La presente invención se extiende adicionalmente a una secuencia de ADN aislada que comprende las secuencias que codifican un polipéptido de la invención pero en la que las secuencias de codificación se dividen en dos o más exones (preferentemente no más de cinco, por ejemplo cuatro o tres). Dichas secuencias de exones pueden ser naturales y obtenidas a partir de clones genómicos, o sintéticas. Las secuencias de exón se pueden usar en la construcción de secuencias de mini-genes que comprenden el ácido nucleico que codifica los polipéptidos de la invención cuyas secuencias están interrumpidas por una o más secuencias de exones.

Los mini-genes además se pueden construir por medio del uso de exones heterólogos, derivados a partir de cualquier fuente eucariota.

Polipéptidos.

Los polipéptidos aislados usados en los métodos de la presente invención serán aquellos como se definió anteriormente en forma aislada, libre o sustancialmente libre del material con el que se asocian de forma natural tal como otros polipéptidos con los que se encuentran en la célula. Los polipéptidos pueden, por supuesto, formularse con diluyentes o adyuvantes y aún para fines prácticos estar aislados - por ejemplo, los polipéptidos normalmente se mezclarán con gelatina u otros portadores si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos. Los polipéptidos pueden ser glicosilados, bien de forma natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas, o pueden ser no glicosilados (por ejemplo, si se producen mediante la expresión en una célula procarionota). Los polipéptidos pueden ser fosforilados y/o acetilados.

Un polipéptido de la invención además puede estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente el polipéptido en una preparación en la que más de 90%, por ejemplo 95%, 98% ó 99% del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la invención.

Los polipéptidos de la invención se pueden modificar por ejemplo mediante la adición de residuos de histidina para ayudar a su purificación o mediante la adición de una secuencia señal para promover su secreción a partir de una célula.

En una modalidad, la presente invención se refiere a las proteínas de fusión, que comprenden los polipéptidos NCAM-180, los fragmentos o los derivados de la presente invención y una proteína heteróloga o parte de una proteína que actúa como una pareja de fusión. Las proteínas de la presente invención y la pareja de fusión pueden estar químicamente conjugadas, pero se expresan preferentemente como proteínas de fusión recombinantes en un sistema de expresión heteróloga. La pareja de fusión puede ser cualquier pareja de fusión inmunológica que pueda ayudar a proporcionar epítopos T auxiliares, o actuar como un potenciador de la expresión. De este modo, la proteína de fusión inmunológica puede actuar a través de un efecto auxiliar espectador unido a la secreción de las señales de activación mediante un gran número de células T específicas para la proteína o péptido extraño, aumenta así la inducción de la inmunidad a la proteína NCAM-180. Preferentemente la pareja heteróloga se selecciona para que la reconozcan las células T en la mayoría de los humanos. El potenciador de la expresión permitirá aumentar los niveles de la proteína NCAM-180 que se producirá, en comparación con la proteína recombinante nativa e incluyen chaperones que ayudan al plegamiento de las proteínas nacientes, en particular las familias Hsp70 o Hsp60 y los dominios C-terminales de dichas proteínas de choque térmico que se sabe que interactúan con las proteínas de sustrato y los péptidos inmunogénicos. Preferentemente la pareja de fusión será tanto una proteína de fusión inmunológica y una pareja potenciadora de la expresión. Por consiguiente, la presente

invencción proporciona proteínas de fusión de las proteínas NCAM-180, los fragmentos o los derivados de acuerdo con la invencción, unidos a una pareja de fusión. En una modalidad adicional, la pareja de fusión se selecciona del grupo que consiste de la proteína no estructural del virus de la gripe, la NS1 (hemaglutinina) o los dominios C-terminal de las familias Hsp70 o Hsp60. Ejemplos adicionales de parejas de fusión inmunológicas se proporcionan en el documento EP 804 156..

Los polipéptidos que tienen al menos 50%, por ejemplo 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 98% de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 2, la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 6 pueden ser polipéptidos que son variantes de la secuencia de aminoácidos, alelos, derivados o mutantes de la sec. con núm. de ident.: 2, la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 6, respectivamente, y además se proporcionan en la presente invencción. Por ejemplo, dicho polipéptido puede tener una secuencia de aminoácido que difiere de la dada en la sec. con núm. de ident.: 2, la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 6 por una o más de adición, sustitución, deleción e inserción de uno o más (tal como a partir de 1 a 20, por ejemplo 2, 3, 4, ó 5 a 10) aminoácidos.

El por ciento de identidad de las secuencias de polipéptidos se puede calcular por medio del uso de los algoritmos disponibles comercialmente que comparan una secuencia de referencia (por ejemplo, la sec. con núm. de ident.: 2, la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 6 de la presente invencción) con una secuencia de consulta. Los detalles adicionales de la evaluación de la identidad se describen a continuación.

Cuando se determina que una secuencia de consulta tiene una identidad con la sec. con núm. de ident.: 2, la sec. con núm. de ident.: 4 o la sec. con núm. de ident.: 6 de al menos 50% y preferentemente al menos 60%, 70%, 80% , 90%, 95% ó 98% dicha secuencia es la de un polipéptido que retiene la actividad de la proteína NCAM-180, tal secuencia forma parte de la presente invencción.

Un polipéptido de acuerdo con la presente invencción se puede aislar y/o purificar (por ejemplo, por medio del uso de un anticuerpo) por ejemplo después de la producción mediante la expresión a partir del ácido nucleico de codificación. El polipéptido aislado y/o purificado se puede usar en la formulación de una composición, que puede incluir al menos un componente adicional, por ejemplo una composición farmacéutica que incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo o portador.

Un polipéptido de acuerdo con la presente invencción se puede usar como un inmunógeno o de otra manera en la obtención de anticuerpos específicos. Los anticuerpos son útiles en la purificación y otras manipulaciones de los polipéptidos, la detección diagnóstica y los contextos terapéuticos.

Un polipéptido de la invencción se puede marcar con una marca reveladora. La marca reveladora puede ser cualquier marca adecuada que permita detectar el polipéptido. Las marcas adecuadas incluyen radioisótopos, por ejemplo el ¹²⁵I, los fluorocromos, las enzimas, los anticuerpos, los polinucleótidos y los enlazadores tales como la biotina. Los polipéptidos marcados de la invencción se pueden usar en procedimientos de diagnóstico, tales como los inmunoensayos con el fin de determinar la cantidad de un polipéptido de la invencción en una muestra. Los polipéptidos o los polipéptidos marcados de la invencción además se pueden usar en inmunoensayos serológicos o mediados por células para la detección de la inmuno reactividad a dichos polipéptidos en animales y humanos por medio del uso de los protocolos estándar.

Un polipéptido o polipéptido marcado de la invencción o un fragmento de estos además se puede fijar a una fase sólida, por ejemplo la superficie de un pocillo o varilla del inmunoensayo.

Dichos polipéptidos marcados y/o inmovilizados se pueden empaquetar en estuches en un envase adecuado junto con los reactivos adecuados, los controles, las instrucciones y similares.

Dichos polipéptidos y estuches se pueden usar en métodos de detección de anticuerpos contra tales polipéptidos presentes en una muestra o porciones activas o los fragmentos de estos mediante el inmunoensayo.

Los métodos de inmunoensayo son bien conocidos en la materia y comprenden generalmente:

- (a) proporcionar un polipéptido que comprende un epítipo enlazable mediante un anticuerpo contra dicha proteína;
- (b) incubar una muestra biológica con dicho polipéptido en condiciones que permitan la formación de un complejo anticuerpo-antígeno; y
- (c) determinar si el complejo anticuerpo-antígeno que comprende dicho polipéptido se forma.

Identidad de secuencia

5 El porcentaje de identidad de las secuencias de ácido nucleico y de polipéptidos se puede calcular por medio del uso de algoritmos disponibles comercialmente que comparan una secuencia de referencia con una secuencia de consulta. Los siguientes programas (proporcionados por el Centro Nacional de Información de Biotecnología) se pueden usar para determinar las homologías/identidades: BLAST, BLAST con interrupciones, BLASTN y PSI-BLAST, que se pueden usar con los parámetros por defecto.

10 El algoritmo GAP (Genetics Computer Group, Madison, WI) usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de ajustes y minimiza el número de interrupciones. Generalmente, los parámetros por defecto se usan, con una penalización de creación de interrupción= 12 y la penalización de extensión de interrupción = 4.

15 Otro método para determinar el mejor ajuste general entre una secuencia de ácido nucleico o una porción de esta, y una secuencia de consulta es el uso del programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag y otros (Comp. App. Biosci., 6; 237-245 (1990)). El programa proporciona una alineación de secuencia general. El resultado de dicha alineación de secuencias general es en por ciento de identidad. Los parámetros adecuados usados en una búsqueda de FASTDB de una secuencia de ADN para calcular el por ciento de identidad son: matriz = unitaria, k-tupla = 4, penalización de desajuste = 1, penalización de unión = 30, longitud de grupo de aleatorización = 0, puntuación de corte = 1, penalización de interrupción = 5, penalización de talla de interrupción = 0,05, y talla de ventana = 500 o longitud de la secuencia de consulta en bases de nucleótidos, la que sea más corta. Los parámetros apropiados para calcular el por ciento de identidad y similitud de un alineamiento de aminoácidos son: matrix = PAM 150, k-tupla = 2, penalización de desajuste = 1, penalización de unión = 20, longitud de grupo de aleatorización = 0, puntuación de corte = 1, penalización de interrupción = 5, penalización de talla de interrupción = 0,05, y talla de la ventana = 500 o longitud de la secuencia de consulta en bases de nucleótidos, la que sea más corta.

Vectores

30 Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención se pueden incorporar en vectores, en particular los vectores de expresión. El vector se puede usar para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. De este modo, en una modalidad adicional, la invención proporciona un método de hacer los polinucleótidos de la invención mediante la introducción de un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introducir el vector en una célula huésped compatible, y crecer la célula huésped bajo condiciones que provocan la replicación del vector. 35 El vector se puede recuperar a partir de la célula huésped. Las células huéspedes adecuadas se describen a continuación en relación con los vectores de expresión.

40 Preferentemente, un polinucleótido de la invención en un vector está unido operativamente a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de codificación por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión.

45 El término "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia de codificación está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

50 Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, que contengan secuencias reguladoras adecuadas, que incluyen las secuencias promotoras, los fragmentos terminadores, las secuencias de poliadenilación, las secuencias potenciadoras, los genes marcadores y otras secuencias según sea adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales por ejemplo fagos, fagémidos o baculovirales, cósmidos, YAC, BAC, o PAC, según convenga. Los vectores incluyen los vectores de terapia génica, por ejemplo, los vectores basados en los adenovirus, los virus adeno-asociados, los retrovirus (tal como el VIH o MLV) o los vectores de virus alfa.

55 Los vectores pueden estar provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo, un gen de resistencia a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a la neomicina para un vector de mamífero. Los vectores se pueden usar *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN o usarse para transfectar o transformar una célula huésped. El vector además se puede adaptar para usarse *in vivo*, por ejemplo en métodos de terapia génica. Los sistemas para la clonación y 60 expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huéspedes se conocen bien. Las células huéspedes adecuadas incluyen las bacterias, las células eucariotas tales como mamíferos y levaduras, y los sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un

polipéptido heterólogo incluyen las células de ovario de hámster chino, las células HeLa, las células de riñón de hámster bebé, las células COS y muchas otras.

5 Los promotores y otras señales de regulación de la expresión se pueden seleccionar para ser compatibles con la célula huésped para la que está diseñado el vector de expresión. Por ejemplo, los promotores de levadura incluyen los promotores de *S. cerevisiae* GAL4 y ADH, promotor de *S. pombe* nmt1 y adh. Los promotores de mamífero incluyen el promotor de la metalotioneína que se puede inducir en respuesta a los metales pesados tales como el cadmio. Los promotores virales tales como el promotor del antígeno T grande del SV40 o los promotores de adenovirus además se pueden usar. Todos estos promotores están fácilmente disponibles en la materia.

10 Los vectores pueden incluir otras secuencias tales como los promotores o los potenciadores para dirigir la expresión del ácido nucleico insertado, las secuencias de ácido nucleico de modo que el polipéptido se produce como una fusión y/o ácidos nucleicos de codificación de las señales de secreción de modo que el polipéptido producido en la célula huésped se secreta a partir de la célula.

15 Los vectores para la producción de los polipéptidos de la invención para el uso en la terapia génica incluyen los vectores que portan una secuencia de mini-gen de la invención.

20 Para más detalles ver, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook y otros, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de los ácidos nucleicos, por ejemplo en la preparación de los constructos de ácido nucleico, la mutagénesis, la secuenciación, la introducción de ADN en las células y la expresión de los genes, y el análisis de proteínas, se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y otros eds., John Wiley & Sons, 1992..

25 Los vectores se pueden transformar en una célula huésped adecuada como se describió anteriormente para proporcionar la expresión de un polipéptido de la invención. De este modo, en un aspecto adicional, la invención proporciona un proceso para preparar polipéptidos de acuerdo con la invención, que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión como se describió anteriormente bajo las condiciones que proporcionen la expresión mediante el vector de una secuencia de codificación que codifica los polipéptidos y recuperar los polipéptidos expresados. Los polipéptidos además se pueden expresar en sistemas in vitro, tales como los lisado de reticulocitos.

35 Una modalidad adicional de la invención proporciona células huéspedes transformadas o transfectadas con los vectores para la replicación y expresión de los polinucleótidos de la invención. Las células se elegirán para que sean compatibles con dicho vector y puede ser por ejemplo bacteriana, de levadura, de insecto o de mamífero. Las células huéspedes se pueden cultivar bajo condiciones para la expresión del gen, de modo que se produce el polipéptido codificado. Si el polipéptido se expresa acoplado a un péptido líder señal adecuado, se puede secretar a partir de la célula al medio de cultivo. Después de la producción mediante la expresión, un polipéptido se puede aislar y/o purificar a partir de la célula huésped y/o del medio de cultivo, como sea el caso, y posteriormente se usa como se desee, por ejemplo, en la formulación de una composición que puede incluir uno o más componentes adicionales, tales como una composición farmacéutica que incluye uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, vehículos o portadores

40 Los polinucleótidos de acuerdo con la invención además se pueden insertar en los vectores descritos anteriormente en una orientación antisentido con el fin de proporcionar la producción de ARN antisentido o las ribozimas.

Métodos de diagnóstico

50 En una modalidad preferida, la invención implica métodos para evaluar los aspectos cuantitativos y cualitativos de la expresión del gen NCAM-180. En un ejemplo la expresión incrementada de un gen o producto del gen NCAM-180 como se proporciona por la presente invención son indicativos de la presencia de SCLC en un sujeto o del riesgo de metástasis de un SCLC en dicho sujeto. Técnicas bien conocidas en la materia, por ejemplo, RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa o transferencia de tipo Northern, se pueden usar para medir los niveles de expresión de NCAM-180.

55 La medición de los niveles de expresión del gen NCAM 180 puede incluir la medición de transcritos de NCAM-180 de origen natural y variantes de los mismos así como de variantes de los mismos de origen no natural. El diagnóstico y/o pronóstico de SCLC en un sujeto, sin embargo se dirige preferentemente a la detección de un producto del gen NCAM-180 de origen natural o variantes del mismo. Así, la invención se refiere a métodos de diagnóstico y/o predicción de SCLC en un sujeto por la medición de la expresión de un gen NCAM-180 en un sujeto. Por ejemplo un incremento del nivel de ARNm codificado por una secuencia de ácido nucleico de NCAM-180 (por ejemplo, sec. con núm. de ident.: 1, 3 ó 5).

- 5 Los métodos de diagnóstico para la detección de moléculas de ácidos nucleicos de NCAM-180 en muestras de pacientes u otras fuentes celulares adecuadas, pueden implicar la amplificación de secuencias de genes específicos, por ejemplo, por PCR (Ver Mullis, K. B, 1987, patente de los Estados Unidos núm. 4.683. 202), seguido por el análisis de las moléculas amplificadas por medio del uso de técnicas bien conocidas para aquellos expertos en la materia, tales como, por ejemplo, los enumerados anteriormente. Por medio del uso de técnicas de análisis tales como éstas, las secuencias amplificadas se pueden comparar a los niveles en muestras controles.
- 10 El diagnóstico y/o pronóstico de SCLC se corresponde con la detección de polipéptidos de origen natural de NCAM-180 en un sujeto. La detección de un polipéptido de NCAM-180 puede ser por cualquier método conocido en la materia.
- 15 El tejido o tipo celular a analizar incluye generalmente aquellos que se conoce, o se sospecha, que expresan el gen NCAM-180, tal como, por ejemplo, células cancerosas que incluyen las células de cáncer de pulmón, y formas metastásicas de las mismas. Los métodos de aislamiento de proteínas que se emplean en la presente descripción pueden, por ejemplo, ser tales como aquellos descritos en Harlow y Lane (Harlow, E. y Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). Las células aisladas se pueden derivar de un cultivo celular o de un paciente.
- 20 Métodos de diagnóstico preferidos para la detección de productos de genes de NCAM 180 o variantes conservadas o fragmentos de péptidos de los mismos, en particular el Exon18_MUM, puede implicar, por ejemplo, inmunoensayos donde los productos de genes NCAM 180 o variantes de los mismos, que incluyen los fragmentos de péptidos tales como Exon18_MUM se detectan por su interacción con anticuerpos selectivos. Por ejemplo, los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, pueden usarse para detectar cuantitativamente o cualitativamente la presencia de polipéptidos codificados de NCAM 180 o variantes de origen natural o fragmentos de péptidos de los mismos. Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) útiles en la presente invención pueden, adicionalmente, emplearse histológicamente, como en inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica, para la detección in situ de los productos del gen NCAM 180 o variantes conservadas o fragmentos de péptidos de las mismas. La detección in situ puede realizarse al retirar una muestra histológica de un sujeto, tal como secciones de tejido embebidas en parafina, por ejemplo, tejido pulmonar, y aplicar al mismo un anticuerpo marcado de la presente invención. El anticuerpo (o fragmento) se aplica preferentemente por la superposición del anticuerpo marcado (o fragmento) sobre una muestra biológica. Ya que el fragmento de NCAM-180 Exon18_MUM parece expresarse predominantemente como una proteína intracelular, puede ser deseable introducir el anticuerpo dentro de la célula, por ejemplo, al hacer la membrana celular permeable. Algunos de los polipéptidos inmunogénicos de NCAM-180 también se pueden expresar en la superficie celular, así las células se pueden marcar directamente por la aplicación de anticuerpos que son específicos o selectivos para los polipéptidos extracelulares de NCAM-180 o fragmentos de los mismos.
- 35 A través del uso de tal procedimiento, es posible determinar no solamente la presencia del producto del gen NCAM-180, o variantes de origen natural de los mismos o fragmentos de péptido, sino además su distribución en el tejido examinado. Por medio del uso de los métodos de la presente invención, los expertos percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) se pueden modificar con el fin de lograr tal detección in situ.
- 40 Los inmunoensayos para los polipéptidos codificados por NCAM-180 o variantes conservadas o fragmentos de péptidos de los mismos, en particular para el Exon18_MUM comprenderán típicamente poner en contacto una muestra, tal como un fluido biológico, tejido o un extracto de tejido, células recién cosechadas, o lisados de células que se incubaron en cultivo celular, en presencia de un anticuerpo que específicamente o selectivamente se une a un producto del gen NCAM-180, por ejemplo, un anticuerpo marcado de forma detectable capaz de identificar polipéptidos de NCAM-180 o variantes conservadas o fragmentos de péptidos de los mismos, y detectar el anticuerpo unido por cualquiera de un número de técnicas bien conocidas en la materia (por ejemplo, transferencia de tipo Western, ELISA, FACS) . La muestra biológica se puede poner en contacto con e inmovilizarse sobre un soporte de fase sólida o portador tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido que es capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte se lava con amortiguadores adecuados seguido por tratamiento con un agente de bloqueo y el anticuerpo marcado que se une selectivamente o específicamente a un polipéptido codificado de NCAM-180. El soporte de fase sólida se lava con amortiguador una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido en un soporte sólido se puede detectar por medios convencionales. Alternativamente, el anticuerpo que se une selectivamente o específicamente a un polipéptido codificado de NCAM-180 se inmoviliza, y la muestra biológica que comprende un
- 60 Por "soporte de fase sólida o portador" se entiende cualquier soporte capaz de unir un antígeno o un anticuerpo. Soportes o portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrana, nailon, nitrocelulosa, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, y magnetita. La naturaleza del portador puede ser

tanto soluble en cierta medida o insoluble para los propósitos de la presente invención. El material de soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Así, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una lámina, tira de prueba, etc. Los soportes preferidos incluyen perlas de poliestireno. Aquellos expertos en la materia conocerán muchos otros portadores adecuados para la unión del anticuerpo o el antígeno, o serán capaces de determinar los mismos por el uso de experimentación de rutina.

El anticuerpo anti-NCAM-180 puede marcarse detectablemente por la unión del mismo a una enzima y por medio del uso del anticuerpo marcado en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)", 1978, Diagnostic Horizons 2: 1, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD); Voller, A. y otros, 1978, J. Clin. Pathol. 31: 507-520; Butler, J. E., 1981, Meth.E4Zy7n01. 73: 482; Maggio, E. (ed.), 1980. Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, FL; Ishikawa, E. y otros, (eds.), 1981, Enzyme Immunoassay, Kagaku Shoin, Tokyo). La enzima que se une al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferentemente un isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

El anticuerpo también puede marcarse detectablemente por medio del uso de metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu , u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales se unen a un anticuerpo por medio del uso de dichos grupos quelantes de metales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los fluorocromos que se usan típicamente son Fluoresceína, Texas Red u otros fluorocromos tales como la serie Alexa Fluor.

El anticuerpo también puede marcarse detectablemente por acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado con quimioluminiscencia se detecta por la luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son el luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Del mismo modo, un compuesto bioluminiscente se puede usar para marcar el anticuerpo de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los cuales una proteína catalítica aumenta la eficacia de una reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina por la detección de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes importantes para el propósito de marcar son luciferina, luciferasa y aecuorina.

En varias modalidades, la presente invención proporciona métodos para la medición de polipéptidos de NCAM-180, y los usos de tales mediciones en aplicaciones clínicas por medio del uso de anticuerpos NCAM-180-específicos o NCAM-180-selectivos.

La medición de polipéptidos de NCAM-180 de la invención es valiosa para detectar y/o estadificar el SCLC, para la detección de SCLC en una población, para el diagnóstico diferencial de la condición fisiológica de un sujeto, y para el seguimiento del efecto de un tratamiento terapéutico en un sujeto.

La presente invención además proporciona para detectar, diagnosticar, o estadificar el SCLC, o para seguir el tratamiento del SCLC por la medición del nivel de expresión de un polipéptido de NCAM-180. Adicionalmente a los polipéptidos de NCAM-180, al menos otro marcador, tal como receptores o antígenos de diferenciación se pueden además medir. Por ejemplo, los marcadores séricos seleccionados a partir de, por ejemplo pero no limitados a, antígeno carcino embrionario (CEA), CA15-3, CA549, CAM26, M29, CA27.29 y MCA se pueden medir en combinación con un polipéptido de NCAM-180 para detectar, diagnosticar, estadificar, o seguir el tratamiento de SCLC. En otra modalidad, el indicador de pronóstico es el cambio observado en los niveles de diferentes marcadores en la relación de uno al otro, más que los niveles absolutos de los marcadores presentes en un momento dado. Estas mediciones también pueden ayudar a predecir los resultados terapéuticos y a evaluar y monitorear la situación general de la enfermedad de un sujeto.

Métodos de vacunación

La invención también se refiere al uso de una vacuna basada en NCAM-180 como un antígeno asociado a tumor (AAT), su epitopo, mimotopo, anticuerpo específico o anti-idiotípico, para preparar un medicamento, así como un estuche para la inmunización activa profiláctica y/o terapéutica contra SCLC. Los antígenos asociados a tumores (AAT) son a menudo la base para el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos para la profilaxis y/o tratamiento del cáncer. Los AAT son estructuras que permiten una diferenciación en relación a los tejidos no-malignos y así se consideran como objetivos para las aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas de los anticuerpos específicos. Los AAT típicamente se expresan en la membrana plasmática de las células tumorales pero también pueden ser proteínas intracelulares lo que incluye proteínas nucleares, citosólicas, y de transmembrana.

5 Aplicaciones terapéuticas directas de los anticuerpos contra AAT se basan en inmunoterapias pasivas, es decir, un anticuerpo específico se administra sistémicamente (o localmente, por ejemplo dentro de una vena que lleva en el tejido) a pacientes con cáncer en una cantidad adecuada y sólo tiene una acción terapéutica hasta tanto su concentración en el organismo es lo suficientemente para esto. La vida-media biológica de tales agentes depende de sus estructuras y se encuentra en el intervalo desde unas pocas horas hasta varios días. Por lo tanto, es necesario proporcionar aplicaciones repetidas. Cuando se usan anticuerpos xenogénicos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales murinos, AcM), esto, sin embargo, conllevará a reacciones inmunes no deseadas las cuales pueden neutralizar una posible actividad terapéutica y pueden causar efectos secundarios peligrosos (reacciones anafilácticas). Por lo tanto, tales agentes terapéuticos inmunes se pueden administrar durante un tiempo limitado solamente.

15 Un enfoque diferente para la inmunoterapia del cáncer se basa en la activación selectiva del sistema inmune de los pacientes con cáncer para combatir las células malignas. Esto se intenta por las formas más diversas de vacunas contra el cáncer. Entre ellas están las vacunaciones con células tumorales irradiadas o inactivadas de otra manera (no proliferativas) autólogas o alogénicas o mezclas de células tumorales autólogas o alogénicas, modificadas químicamente o por biología molecular, AATS aislados o AATS preparados con la ayuda de métodos químicos o de biología molecular, péptidos derivados a partir de estos, más recientemente además vacunación con ADN que codifica para AAT o estructuras derivadas de estos, etc. Un método alternativo se basa en el uso de anticuerpos anti-idiotípicos para la vacunación contra el cáncer. Anticuerpos anti-idiotípicos adecuados pueden imitar inmunológicamente a un AAT. Como proteínas extrañas (por ejemplo, anticuerpos murinos, anticuerpos de cabra, etc.) ellos inducen una fuerte respuesta inmune en humanos después de una vacunación en contraste a los antígenos tumorales humanos propios, los cuales, al ser auto-estructuras, a menudo son de solamente poca inmunogenicidad. Por lo tanto, los anticuerpos anti-idiotípicos se pueden usar como un sustituto inmunogénico de un antígeno de tumor para propósitos de vacunación.

30 En contraste con las inmunoterapias pasivas por medio del uso de anticuerpos anti-tumorales, en principio muy pequeñas cantidades de una vacuna adecuada podrían ser suficientes para la inmunoterapia activa específica del cáncer como para inducir una inmunidad por meses o incluso años la cual, cuando se vuelve más débil, se puede reforzar por las vacunaciones reforzadoras. Además, en una inmunización activa ambas una inmunidad humoral y además una celular se pueden inducir cuya interacción puede rendir una acción protectora eficaz.

En resumen, hasta ahora el uso de anticuerpos o sus derivados en la inmunoterapia del cáncer se ha basado esencialmente en dos principios:

- 35 • La terapia pasiva con anticuerpos o sus derivados los cuales están dirigidos contra AAT. En este caso, las células tumorales se destruyen relativamente específicamente (Immunology Today (2000), 21: 403-410; Curr. Opin. Immunol. (1997), 9: 717).
- 40 • La inmunización activa (vacunación) con células, AAT, o anticuerpos, respectivamente, o sus derivados, los cuales se dirigen contra el idiotipo de anticuerpos que tienen una especificidad frente a AAT. La vacunación activa desencadena una respuesta inmune contra AAT. Esta respuesta inmune así también se dirige contra las células tumorales correspondientes (Ann. Med (1999), 31: 66; Immunobiol (1999), 201:1).

45 La presente invención ahora tiene como objeto proporcionar una vacuna basada en una NCAM-180 como antígeno asociado a tumor (AAT), su epitopo, mimótopo, anticuerpo específico o anti-idiotípicos se usa para preparar un medicamento el cual se emplea para la inmunización activa profiláctica y/o terapéutica contra SCLC, opcionalmente en combinación con quimioterapia.

50 El AAT preferentemente se selecciona a partir del grupo de los péptidos o proteínas como se describe en la presente descripción, en particular NCAM-180 o el Exon18_MUM como se describe en la presente descripción antes. En incluso una modalidad adicional el AAT se selecciona a partir del grupo que consiste en:

- una proteína aislada que consiste esencialmente de sec. con núm. de ident.: 2, sec. Con núm de ident.: 4, sec. con núm. de ident.: 6, o
- a un fragmento de dichas proteínas aisladas, donde dicho fragmento es capaz de inducir una respuesta inmune humoral o celular en un mamífero y comprende un epítipo seleccionado de;
- 55 PAASNLSSSVLAN (AA 101-113 de sec. con núm. de ident.: 2), VLSPSAPAGVG (AA 117-127 de sec. con núm. de ident.: 2), LAAAAAPATEAPQ (AA 153-165 de sec. con núm. de ident.: 2), KGPDPPEPTQPGA (AA 174-185 de sec. con núm. de ident.: 2) y DFKMDEGNFK (AA 216-225 de sec. con núm. de ident.: 2).

60 Los AAT que se usan en la vacuna de acuerdo a la invención preferentemente inducen una respuesta inmune funcional dirigida contra las células tumorales. Al hacer esto, no sólo las células tumorales durante su división celular, pero además en el estado inactivo (por ejemplo, células madre de tumor como se mostró recientemente), se atacan por un tratamiento eficaz de la "enfermedad residual mínima", o la reducción del potencial de metástasis. De

acuerdo con la invención, preferentemente SCLC ("cáncer de pulmón de células pequeñas") se podrán o se puede tratar.

5 En una modalidad particular, de acuerdo con la invención al menos dos epítomos iguales o diferentes del AAT NCAM-180, se proporcionan, o imitan, respectivamente, en la vacuna. Así, por la inmunización activa, se pueden generar una pluralidad de anticuerpos con especificidad para la misma molécula, sin embargo, para diferentes sitios de unión de NCAM-180.

10 La vacuna también puede comprender un anticuerpo glicosilado, especialmente si la propia glicosilación también puede imitar un epítomo de un epítomo de carbohidrato del AAT. Este anticuerpo puede imitar particularmente bien antígenos tumorales celulares, y por consiguiente, causa la respuesta inmune deseada para la inhibición de las células tumorales epiteliales.

15 De acuerdo a la invención, la vacuna se puede usar para la inmunización activa, y por lo tanto se administra en pequeñas cantidades solamente. Así, no se esperan efectos secundarios particulares, particularmente fiebre y aumento en el nivel de glucosa, incluso si la sustancia inmunógena activa que se usa de acuerdo con la invención se deriva de especies no-humanas, tales como un anticuerpo murino. Sin embargo, se asume que una sustancia activa recombinante, quimérica, así como humanizada o humana combinada con componentes murinos y humanos será particularmente adecuada para una administración a humanos. Por otra parte, una porción murina en la
20 sustancia activa por ser extraña puede adicionalmente provocar la respuesta inmune en humanos.

Aunque, naturalmente, la vacuna que se usa según la invención puede contener una sustancia activa derivada de un anticuerpo nativo, el cual posiblemente se aisló a partir de un organismo o paciente, a menudo se usa un derivado de anticuerpo el cual preferentemente se selecciona a partir de un grupo de fragmentos de anticuerpos, conjugados u homólogos, pero además complejos y adsorbatos. En cualquier caso, se prefiere para el derivado de anticuerpo que contenga al menos partes del fragmento Fab, preferentemente junto con al menos partes del fragmento F(ab')₂, y/o partes de la región bisagra- y/o de la parte Fc de un anticuerpo lambda o kappa. Adicionalmente, además un derivado de anticuerpo de simple cadena, tal como el llamado anticuerpo de simple cadena se puede usar en una vacuna como se define por la invención. Preferentemente, se usa un anticuerpo del tipo de una inmunoglobulina, por ejemplo, una IgG, IgM o IgA. Particularmente preferentemente se usa un anticuerpo IgG2a, a partir de que los anticuerpos IgG2a exhiben una activación del complemento particularmente buena, lo que resulta en un incremento de la inmunogenicidad de la vacuna. Esto, además, tiene la ventaja de que el contenido del anticuerpo en la vacuna se puede reducir aún más.

35 De acuerdo a la invención, preferentemente además se usa una vacuna la cual comprende un anticuerpo o un derivado de anticuerpo dirigido contra un antígeno asociado a tumor, es decir, un Ab1. La especificidad del anticuerpo preferentemente se elige a partir de los grupos antes mencionados de los AATs, en particular seleccionado del grupo de NCAM-180 o Exon18_MUM.

40 La vacuna que se usa de acuerdo a la invención ventajosamente se proporciona en una formulación adecuada. Las preferidas son aquellas formulaciones con un portador farmacéuticamente aceptable. Esto comprende, por ejemplo, sustancias auxiliares, amortiguadores, sales, conservantes. La vacuna puede usarse, por ejemplo, para la profilaxis y terapia de las afecciones asociadas al SCLC, tales como la formación de metástasis y la enfermedad residual mínima de los pacientes con cáncer. En este caso, las células presentadoras de antígeno se modulan específicamente *in vivo* o además *ex vivo*, como para generar específicamente la respuesta inmune contra el AAT y las células tumorales.

50 Por consiguiente, en caso de una inmunización activa, es además un objeto de la presente invención proporcionar una formulación vacunal que contiene la sustancia activa inmunogénica en la mayoría de los casos solamente a concentraciones bajas, tales como en una cantidad inmunogénica en el intervalo desde 0,01 [mu]g a 10 mg. En dependencia de la naturaleza del AAT, su epítomo, mimotopo, anticuerpo específico o anti-idiotípico, en dependencia del uso de secuencias extrañas a la especie o derivatización, pero además en dependencia de los agentes auxiliares o adyuvantes, respectivamente, que se usan, la dosis inmunogénica adecuada se elegirá, por ejemplo, en el intervalo desde 0,01 [mu]g a 750 [mu]g, preferentemente 100 [mu]g a 500 [mu]g. Una vacuna de depósito la cual se va a suministrar al organismo durante un período prolongado de tiempo puede, sin embargo, además contener cantidades mucho más altas de anticuerpos, tal como desde al menos 1 mg hasta no más de 10 mg. La concentración dependerá de la cantidad administrada de la vacuna líquida o suspendida. Una vacuna usualmente se proporciona en jeringuillas listas-para usar que tienen un volumen desde 0,01 a 1 ml, preferentemente de 0,1 a 0,75 ml, de la solución concentrada, o suspensión, respectivamente.

60 Para la inmunización pasiva como se describe en la presente descripción anteriormente, la presente invención proporciona además una formulación vacunal que comprende los anticuerpos específicos por AAT en el intervalo de desde 1 mg a 10 g, preferentemente desde 10 mg a 1 g.

5 La vacuna que se usa según la invención presenta preferentemente el inmunógeno o anticuerpo en un portador farmacéuticamente aceptable el cual es adecuado para una administración subcutánea, intramuscular o además intradérmica o transdérmica. Un tipo adicional de administración es a través de la vía mucosal, tal como la vacunación por administración nasal o por vía oral. Si se emplean sólidos como agentes auxiliares para la formulación vacunal, por ejemplo, se administra un adsorbato o una mezcla en suspensión del anticuerpo con el agente auxiliar. En modalidades especiales, la vacuna se administra como una solución, o vacuna líquida, respectivamente, en un solvente acuoso.

10 Preferentemente, una o más unidades de vacuna de la vacuna tumoral ya se proporcionan en jeringuillas adecuadas listas-para-usar. Como un anticuerpo es relativamente estable en comparación con el AAT, las vacunas basadas en anticuerpos o sus derivados tienen la ventaja esencial de que se pueden poner en el mercado como una solución estable al almacenamiento o suspensión en una forma lista-para-usar. Sin embargo, un contenido de agentes conservantes, tales como, timerosal u otros agentes conservantes con una mejor tolerancia no es necesario, puede, sin embargo, proporcionarse en la formulación para una mayor durabilidad a temperaturas de almacenamiento desde la temperatura del refrigerador hasta la temperatura ambiente. La vacuna que se usa de acuerdo con la invención puede, sin embargo, también proporcionarse en forma congelada o liofilizada la cual puede descongelarse, o reconstituirse, respectivamente, cuando sea necesario.

20 En cualquier caso, demostró ser adecuado aumentar la inmunogenicidad de la sustancia activa que se usa de acuerdo a la invención por medio del uso de adyuvantes en la formulación vacunal. Por lo tanto los adyuvantes de vacunas adecuados son preferentemente el hidróxido de aluminio (Alu gel) o fosfato, también factores de crecimiento, linfocinas, citocinas, tales como IL-2, IL-12, GM-CSF, interferón gamma o factores de complemento, tales como C3d, además de preparaciones de liposomas, y además formulaciones con antígenos adicionales, contra los cuales el sistema inmune ya produjo una fuerte respuesta inmune, tales como el toxoide tetánico, toxinas bacterianas, tales como exotoxinas de Pseudomonas y derivados de lípido A.

30 Se prefiere un adyuvante el cual permita que el medicamento se administre sin ningún efecto secundario. El término efectos secundarios abarca, por ejemplo, un aumento del nivel de glucosa o fiebre; enrojecimientos locales en el sitio de administración o ligera inflamación no se consideran efectos secundarios especiales, pero indican que tiene lugar una reacción inmune. Para formular la vacuna, además métodos conocidos adicionales para conjugar o desnaturalizar componentes de la vacuna se pueden usar para aumentar aún más la inmunogenicidad de la sustancia activa. Las modalidades particulares de la vacuna que se usan de acuerdo con la invención comprenden antígenos de vacunación adicional, en particular anticuerpos anti-idiotípicos adicionales, también mezclas de anticuerpos inmunogénicos con varios anticuerpos los cuales se administran simultáneamente.

40 Cuando se combina con la quimioterapia, el uso de acuerdo con la invención de la vacuna es preferentemente al inicio de la quimioterapia. Preferentemente, la quimioterapia se inicia dentro de 1 a 2 semanas. Una vacuna simultáneamente con y/o durante la quimioterapia también se prefiere por razones prácticas. El paciente ya está bajo tratamiento clínico, las medidas terapéuticas adicionales son fáciles de llevar a cabo. Si la inmunoterapia se efectúa ya en el primer día de la quimioterapia o dentro de los primeros 2 a 3 días, el sistema inmune puede activarse ya en un punto temprano de tiempo, incluso antes de que el organismo se vea afectado adversamente por la quimioterapia. La quimioterapia, de hecho, tiene efectos secundarios, tales como el de un sistema inmune debilitado, lo cual hace al paciente cada vez más propenso a la infección. Precisamente por esta razón, fue sorprendente que la inmunoterapia se puede usar con éxito inmediatamente antes y durante la quimioterapia. Así, se pudo observar que la respuesta inmune después de la inoculación con una vacuna de tumor se podía inducir en el primer día, varias horas antes del inicio de la quimioterapia, en la misma medida como sin un tratamiento quimioterapéutico. En cualquier caso, el contenido en suero de inmunoglobulinas y anticuerpos específicos por el antígeno de la vacunación se aumentó persistentemente, con independencia de una quimioterapia. Incluso hubo indicios de que la respuesta inmune específica incluso se incrementó por la quimioterapia.

55 El régimen de administración de la vacuna según la invención contiene preferentemente no sólo la vacunación inicial dentro del alcance de la quimioterapia, pero también varias vacunas de refuerzo a ciertos intervalos de tiempo los cuales por razones prácticas, posiblemente, pueden ser iguales a los intervalos de la quimioterapia. También a continuación de la quimioterapia, la inmunoterapia a largo plazo durante meses y años en gran medida es un régimen adecuado. Ambas, la vacunación inicial y también vacunaciones posteriores de refuerzo preferentemente se efectúan con la misma vacuna. Se prefiere la combinación con el adyuvante o la quimioterapia paliativa. La combinación con una monoterapia o politerapia es posible. Por razones de los diferentes mecanismos de acción, la vacuna preferentemente se combina con la poliquimioterapia.

60 Los agentes preferidos que se usan para la quimioterapia son preparaciones farmacéuticas alquilante. Así, por ejemplo, se prefieren agentes que contienen taxanos, antraciclinas o platino. Todas las preparaciones convencionales que se usan para varios tratamientos contra el cáncer se pueden combinar de acuerdo con la

invención. Los agentes quimioterapéuticos se administran comúnmente por vía intravenosa o por vía oral. Las formas de administración por vía oral de los agentes quimioterapéuticos pueden posiblemente además administrarse con la forma por vía oral de la vacuna de acuerdo con la invención como una preparación de combinación.

5 Una vacunación como se define por la presente invención puede básicamente llevarse a cabo tanto para un tratamiento terapéutico y además para un tratamiento profiláctico. Tal vacunación profiláctica particularmente, aunque no exclusivamente-tiene como objetivo a personas que se diagnosticaron con SCLC y la cuales pueden tener pequeñas (células individuales latentes, pequeñas metástasis) metástasis, pero que actualmente se encuentra libres de cualquier signo de la enfermedad. En tal caso la vacuna sería una vacuna profiláctica en que induce una
10 respuesta inmune la cual puede ser útil contra un futuro brote de SCLC.

En una modalidad preferida, la vacuna que se usa de acuerdo a la invención comprende un producto del gen NCAM-180 o un anticuerpo contra este producto de gen, o un anticuerpo anti-idiotípico correspondiente, respectivamente. Los métodos de formulación de una vacuna apropiada para el método de la invención son conocidos:

- 15 • El AAT NCAM-180, sus derivados, epítomos y miméticos se pueden obtener a partir de fuentes naturales o sintéticas. Además los componentes de anticuerpos se pueden sintetizar químicamente y conectarse subsecuentemente con estructuras de epítomo, o sintetizarse en común. En una síntesis química de moléculas portadoras de anticuerpos es posible introducir grupos reactivos en sitios especiales con el fin de ser capaces tanto de controlar la extensión del acoplamiento con un epítomo, así como el tipo y la localización de la unión.
- 20 • El AAT NCAM-180 inmunogénico, sus epítomos, miméticos o anticuerpos, se pueden preparar además como moléculas recombinantes por métodos de ingeniería genética. Al cambiar los ácidos nucleicos modificados genéticamente los cuales codifican moléculas nativas, por ejemplo se pueden producir derivados adecuados. Una glicosilación de un producto génico recombinante con las correspondientes estructuras de glicanos asociados a tumores se puede además efectuar por una producción en células las cuales se modificaron genéticamente de tal manera que ellas por consiguiente glicosilarán las proteínas. Tales células pueden ser aislados naturales (clones celulares), ellos se puede encontrar por una detección adecuada para la glicosilación deseada. Sin embargo, además las células se pueden modificar de tal manera que ellas expresarán las correspondientes enzimas requeridas para la glicosilación deseada tal que
25 particularmente la glicosilación deseada se encontrará en el polipéptido o proteína recombinante (Glycoconj. J. (1999), 16: 81). Sin embargo, también es posible producir enzimáticamente, o cambiar, respectivamente, el patrón de glicosilación de proteínas (Clin. Chem. Lab. Med(1998), 36: 373).
- 30 • De acuerdo con una modalidad particular de la presente invención, la vacuna que se usa de acuerdo con la invención comprende una molécula de ácido nucleico como un precursor para el AAT NCAM-180, donde la molécula de ácido nucleico codifica productos del gene de NCAM-180 como se define por la presente invención. La vacuna de ADN que se obtiene se administra tal como vacunas contra el cáncer que se basan en proteínas.
35

La presente invención también se refiere a un estuche que es adecuado para el tratamiento profiláctico y/o
40 terapéutico de afecciones asociadas con SCLC. Este estuche comprende

- a) una vacuna basada en el antígeno asociado a tumor NCAM-180, su epítomo, mimótomo, el anticuerpo específico o anti-idiotípicos, y opcionalmente
- b) un agente para quimioterapia.

45 La selección de los componentes del estuche de acuerdo con la invención así como su combinación se lleva a cabo como se describió antes. Preferentemente, el estuche comprende adicionalmente dispositivos de aplicación adecuados, como, por ejemplo, jeringuillas, dispositivos de infusión, etc. Si la vacuna se proporciona en forma liofilizada, el estuche contendrá adicionalmente una solución de reconstitución adecuada la cual comprende opcionalmente estabilizadores especiales o aceleradores de la reconstitución. El estuche más preferido comprende
50 varias unidades de la vacuna que se usan según la invención, las cuales se emplearán para la vacunación inicial así como por una o más, preferentemente hasta tres, vacunaciones de refuerzo.

El número de vacunaciones de refuerzo puede, sin embargo, también ser más alto, y por esto, se ofrecen los estuches que contienen solo varias unidades de vacunación, sin una combinación con un agente quimioterapéutico.
55 La frecuencia opcionalmente estará en el intervalo desde 1 a 12 por año, se prefiere particularmente el intervalo desde 4 a 8 por año. La dosis puede permanecer igual o puede disminuir. Las vacunas de refuerzo se pueden llevar a cabo a intervalos regulares, en principio durante toda la vida. Intervalos adecuados varían desde aproximadamente 6 a 24 meses y se pueden determinar por la comprobación del título de la respuesta de CTL inducida (un refuerzo debe hacerse tan pronto como los títulos de la respuesta de CTL inducida decaigan
60 marcadamente).

La presente invención se entenderá mejor por referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero los expertos en la materia apreciarán fácilmente que éstos son solamente ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen posteriormente. Adicionalmente, a lo largo de toda esta solicitud, se citan varias publicaciones.

5

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Otras modalidades ocurrirán a los expertos en la materia a la luz de estos ejemplos.

10

Experimentos para investigar la expresión diferencial de NCAM-180 (Exon18_MUM) en varios linajes celulares.

La expresión diferencial de NCAM-180 se evaluó en diferentes líneas celulares de cáncer y controles sanos, por medio del uso de procedimientos conocidos en el arte que incluyen;

15

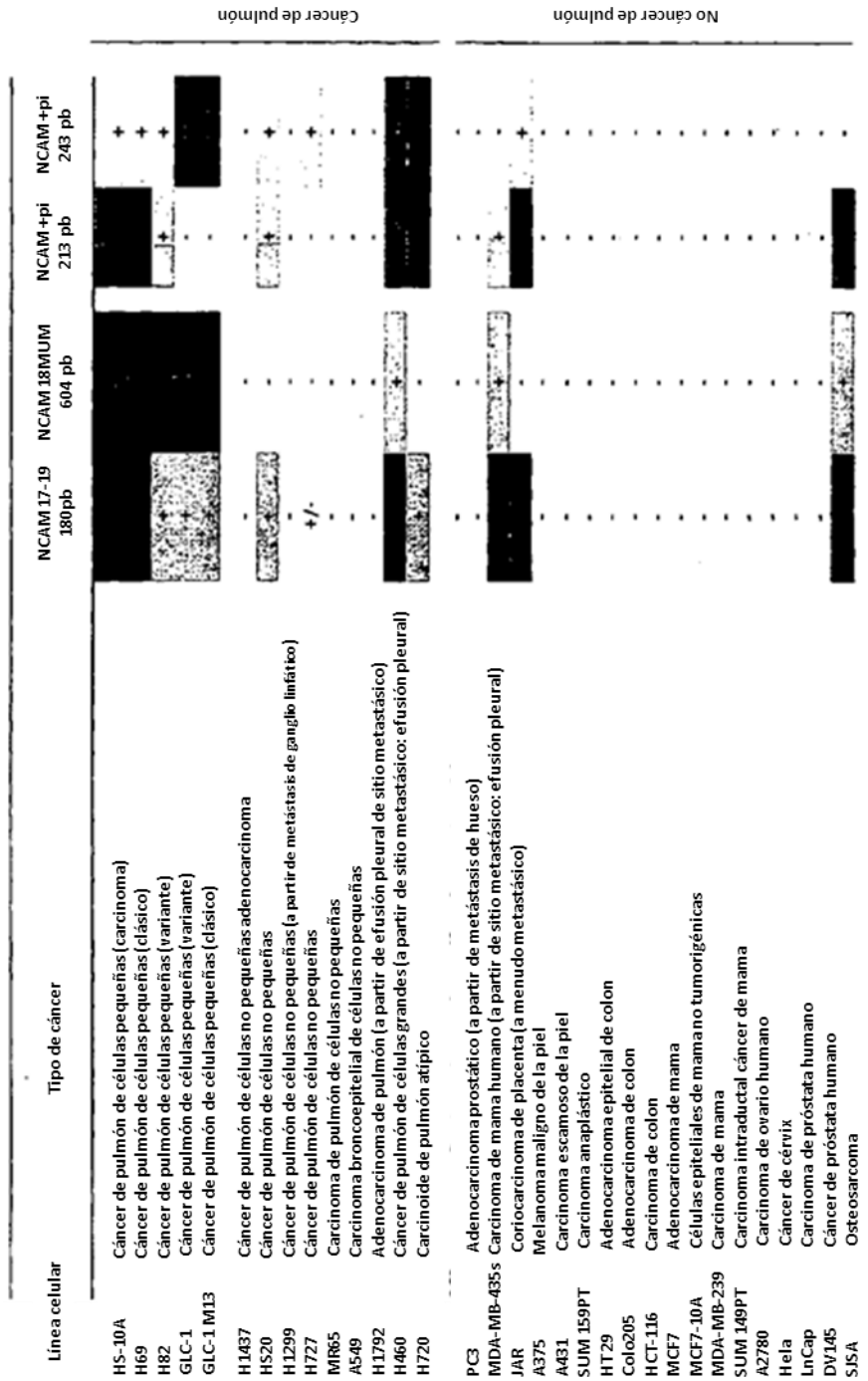
- Extracción de ARN y síntesis de ADNc de acuerdo a procedimientos estándar, y
- Amplificación por PCR para evaluar la expresión de Exon18_MUM de acuerdo con el principio representado en la **figura 1**.

20

Una expresión de NCAM Exon18_MUM como parte de NCAM-180 se encontró en cultivos de células derivadas de tumores neuroendocrinos (SH-SY5Y y CCI) y una clara sobre-expresión más particularmente en líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) (**Figura 2**). Los resultados para las otras líneas celulares se resumen en la tabla 1

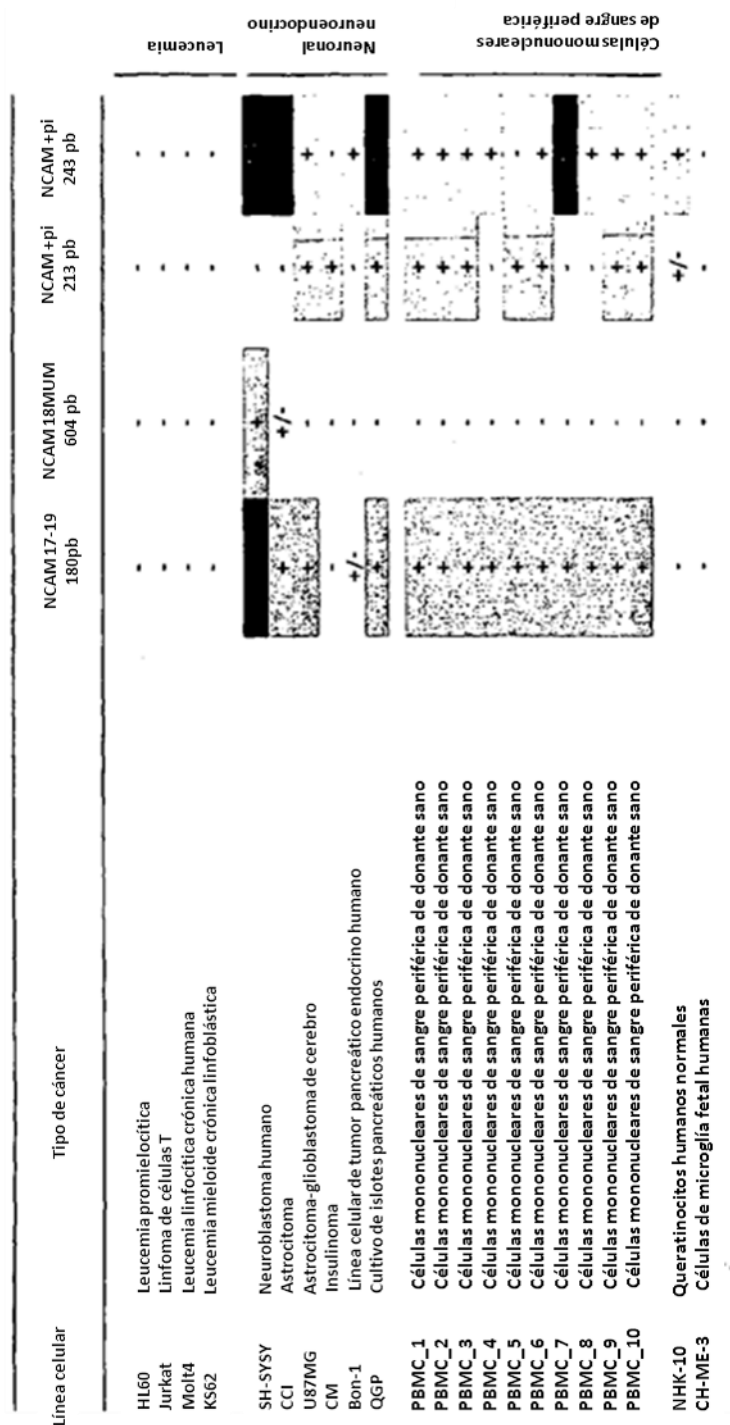
25

Tabla 1: Expresión diferencial de Exon18_MUM (NCAM-180) en células de cáncer y controles sanos. Código alta expresión (++), expresión normal (+), baja expresión (+/-), no expresión (-)



Cáncer de pulmón

No cáncer de pulmón



Clonación y purificación de NCAM Exon18_MUM

A. Clonación de NCAM Exon18_MUM

5 Se diseñaron cebadores de PCR. La secuencia de nucleótidos del Exon18_MUM completo (816 nt) (sec. con núm. de ident.: 1) y la secuencia de nucleótidos de una forma truncada del Exon18_MUM (369 nt) (sec. con núm. de ident.:5) se recogieron a partir de ADNc de células H69. Se mostró que estas células sobreexpresan el Exon18_MUM. Ambos el cebador directo y el inverso contenían sitios de restricción para la subclonación dentro de pRSET (producción de proteínas) y el vector pCI (inmunización con ADN).

10

El ADN que codifica el NCAM Exon18_MUM, ambos el Exon18_MUM de longitud completa y el truncado, se clonaron con éxito en:

- 5 o pRSET (Invitrogen) un constructo usado para la producción de proteínas, que produce proteínas recombinantes etiquetadas con His en *E. coli* con la siguiente secuencia de proteína (sec. con núm. de ident. 2);
 (la versión truncada se muestra en cursiva – sec. con núm. de ident. 6)
- ```

 1 lpadttatve dmlpsvttvt tnsdtitetf ataqnsptse ttlttssiap
 51 patatpdsns vpaggatpsk gpsasapsa pasapkvapl vdlstdtptst
 101 paasnlsssv lanqgavlsp sapagvgeas kappaskptp apvptptgaa
 151 splaaaaapa teapqakqea pstkgpdpep tqpgaakspa eaatalaspk
 201 seaasvsttn psqgedfkmd egnfktpdid lakdvfaalg spapaagasg
 251 qapelapsta dssvspapak t

```

- 10 o pCI (Promega) un constructo de ADN que se usa para la inmunización.

**B. Producción y purificación de proteínas de NCAM Exon18\_MUM**

15 Las bacterias se transformaron con constructos de expresión (pRSET, Invitrogen) que codifican la proteína Exon18\_MUM. Se usó un constructo pRSET que codifica la proteína NCAM Exon18\_MUM truncada (marcada en cursiva en la secuencia de la proteína NCAM Exon18\_MUM arriba) y un constructo pRSET que codifica la secuencia de la proteína de longitud completa NCAM Exon18\_MUM. La transformación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Ambas formas de la proteína se expresaron como proteínas etiquetadas con His y la purificación se realizó en columnas de quelato de Ni de acuerdo con procedimientos estándar. Las proteínas etiquetadas con His se eluyeron a partir de las columnas por medio del uso de 300 mM de imidazol, y las soluciones de proteínas eluidas subsecuentemente se re-naturalizaron por medio del uso de una diálisis estándar contra PBS. La pureza de los productos de proteína NCAM Exon18\_MUM se muestra en la **Figura 3 A y B.**

25 **Experimentos para validar el potencial inmunogénico de NCAM-180 y los productos génicos de NCAM-180 como un antígeno candidato**

**C. Inmunizaciones y mediciones de la respuesta inmune**

30 **C1.La inmunización con NCAM Exon18\_MUM induce respuestas inmunes celulares**

Basado en la expresión diferencial de PCR, la variante empalmada de NCAM Exon18\_MUM se identificó como un objetivo potencial para la inmunoterapia del cáncer de pulmón. Como se describió anteriormente, para este nuevo antígeno se prepararon ambos el ADN y la proteína recombinante. Por medio del uso del procedimiento anterior, la proteína truncada MUM se produjo en *E. coli*, se purificó y subsecuentemente se usó para la inmunización de ratones Balb/c.

C1.1 Inmunización con la proteína Exon18\_MUM y/o ADN de Exon18\_MUM y re-estimulación *in vitro* con una mezcla de péptidos 9-meros superpuestos.

40 En un primer tipo de experimento, algunos ratones se indujeron, en lo sucesivo también referido como inmunizan, con la proteína Exon18\_MUM truncada en PBS, ya sea con o sin un adyuvante tal como Abisco-100 y algunos se inmunizaron con ADN que codifica la Exon18\_MUM. Adicionalmente, la inmunización con la proteína Exon18\_MUM se combinó con la inmunización de ADN de Exon18\_MUM. Al día 21, estos diferentes grupos se reforzaron como se muestra a continuación:

45 **Observación:**

- La proteína Exon18\_MUM se representa en la tabla como proteína MUM.
- El ADN de Exon18\_MUM se representa en la tabla como ADN MUM
- El adyuvante que se usó es Abisco-100

|   |                  | Inmunización t=0 | Refuerzo t=21 días |
|---|------------------|------------------|--------------------|
| 1 | 4 BALB/c hembras | PBS              | PBS                |
| 2 | 4 BALB/c hembras | vector pCI vacío | vector pCI vacío   |
| 3 | 4 BALB/c hembras | Adyuvante Abisco | Adyuvante Abisco   |



|   |                  | Inmunización t=0           | Refuerzo t=21 días         |
|---|------------------|----------------------------|----------------------------|
| 4 | 4 BALB/c hembras | Proteína MUM en Abisco     | Proteína MUM en Abisco     |
| 5 | 4 BALB/c hembras | Proteína MUM sin adyuvante | Proteína MUM sin adyuvante |
| 6 | 4 BALB/c hembras | ADN MUM                    | ADN MUM                    |
| 7 | 4 BALB/c hembras | ADN MUM                    | Proteína MUM en Abisco     |

Para la inmunización de proteína se usó:

- 10 µg de proteína recombinante Exon18\_MUM en PBS, opcionalmente formulada con 12 µg de Absico-100.

Para la inmunización de ADN se usó:

- 2 x 50 µg de ADN Exon18\_MUM (en vector pCI) (50 µg dentro del M. tibial anterior de cada una de las dos patas traseras)

Ratones BALB /c (n = 4 en cada grupo) se inmunizaron el día 0 y reforzaron en el día 21. Treinta días después de la primera inmunización, los bazo de ratón se aislaron, se prepararon suspensiones de células de bazo y se sembraron a una densidad de  $1,5 \cdot 10^6$  células/pocillo. La re-estimulación *in vitro* se realizó por 4h a 37°C (5% CO<sub>2</sub>). La re-estimulación se realizó con una mezcla de péptidos 9-meros superpuestos que cubre la secuencia de longitud completa de aminoácidos de la proteína MUM truncada. Se usaron un total de 45 péptidos superpuestos. Se calculó el número de células que contenían IFN-γ intracelular en  $10^5$  células CD8 positiva para todos ratones inmunizados, como se determina por citometría de flujo (**Figura 4 grupo A-G**). Los datos muestran un bajo número de células T CD8 positivas que contienen IFN-γ intracelular lo que representan una respuesta limitada CTL en los animales inmunizados y reforzados con la proteína Exon18\_MUM (**Figura 4 grupo D**). Los ratones inmunizados con proteína Exon18\_MUM en adyuvante Abisco-100 aparentemente no indujeron una respuesta de CTL en absoluto (**Figura 4 grupo C**). Para los ratones inmunizados con ADN de Exon18\_MUM se encontró que la inyección intramuscular del ADN que codifica la Exon18\_MUM truncada indujo claramente una respuesta de células T citotóxicas específica por MUM (**Figura 4 grupo F y G**), cuando se compara con los ratones inmunizados solo con el vector pCI, realizada como inmunización control. Se encontraron 727 células que contenían IFN-γ intracelular de un total de  $10^5$  células T CD8 positivas (0,7%). Los datos sugieren incluso un ligero incremento en el número de células T CD8 positivas células que contenían IFN-γ intracelular para los ratones inmunizados con ADN de Exon18\_MUM y reforzados con proteína Exon18\_MUM con Abisco-100 (887 células T  $10^5$  CD8 positivas que contenían IFN-γ intracelular, 0,9%). Para todos los bazo se realizó como un control negativo, una re-estimulación *in vitro* con una mezcla de péptidos irrelevantes (IPP). Aquí, como control una mezcla de péptidos que cubre una región de NCAM que difiere a partir de la secuencia de Exon18\_MUM, tal como por ejemplo la región del exón 7pi8 de NCAM de la proteína NCAM. En el presente ejemplo, la IPP consistió de 17 péptidos superpuestos (9-meros, superposición de 5 aminoácidos) que abarcan una secuencia de 76 aminoácidos de la región del exón 7pi8 de NCAM de la proteína NCAM.

Ni para los animales inmunizados con la proteína recombinante Exon18\_MUM, ni para los animales inmunizados con ADN de Exon18\_MUM, se encontraron células T CD8 positivas que contenían IFN-γ intracelular tras la re-estimulación con esta IPP. Ya que las células T de los animales inmunizados no se pueden re-estimular con una IPP, se concluye que la inmunización con MUM induce células-T específicas por MUM.

Basados en este experimento se concluye que la inmunización con la proteína recombinante Exon18\_MUM y el ADN que codifica Exon18\_MUM induce una respuesta de células- T específica por MUM. La Inmunización con la proteína Exon18\_MUM sólo dio lugar a un número limitado células T CD8 positivas que contenían IFN-γ intracelular, mientras que la inmunización con ADN que codifica Exon18\_MUM indujo una significativa respuesta inmune celular específica por MUM.

Basados en los resultados de estos experimentos se concluye que:

- o la inmunización con ADN de Exon18\_MUM induce una significativa respuesta de células T citotóxicas específica por MUM.
- o la proteína truncada Exon18\_MUM sola es inmunogénica e induce una respuesta de CTL específica por MUM, como se identificó tras la re-estimulación con una mezcla de péptidos 9-meros superpuestos relacionados con MUM.

C 1.2 Inmunización con proteína Exon18\_MUM y/o ADN de Exon18\_MUM, re-estimulación *in vitro* con una mezcla de péptidos 9-meros superpuestos

En el siguiente tipo de experimento se usaron para la re-estimulación *in vitro* péptidos 9-meros individuales que cubren la secuencia de la proteína Exon18\_MUM truncada (péptidos 9-meros, superpuestos 5-meros), y no la

mezcla de péptidos 9-meros total descrita antes en la presente descripción. La re-estimulación *in vitro* con péptidos 9-meros individuales se llevó a cabo con el fin de realizar un mapeo detallado de los epítomos de CTL en la secuencia de la proteína Exon18\_MUM. En cada experimento se usaron 11 animales, 1 ratón control negativo, y dos grupos cada uno de 5 animales que se inmunizaron por grupo como se muestra más abajo en el día 0 y se reforzaron como se muestra más abajo en el día 21:

- Grupo 1: 1 ratón inmunizado y reforzado con 100 µg de vector pCI vacío
- Grupo 2: 5 ratones inmunizados y reforzados con 100 µg de ADN MUM
- Grupo 3: 5 ratones inmunizados y reforzados con 210 µg de proteína NCAM 18MUM.

Se hicieron nueve experimentos, cada uno con 11 animales.

Cuarenta y cinco animales se inmunizaron con la proteína Exon18\_MUM truncada, 45 animales con ADN de Exon18\_MUM truncada y 9 animales con el vector pCI vacío.

En cada experimento los ratones se sacrificaron 12 - 14 días después del refuerzo. Los bazo se extirparon, se prepararon suspensiones de células de bazo, se sembraron en placas de 96 multipocillos, y se re-estimularon *in vitro* con péptidos 9-meros individuales de NCAM Exon18\_MUM. En cada experimento se probaron 5 péptidos para la re-estimulación *in vitro*, el experimento se repitió 9 veces, se probaron en total 45 péptidos. Este mapeo de epítomos nos permitió localizar los mejores epítomos para CTL en la proteína Exon18\_MUM truncada.

La re-estimulación *in vitro* se realizó con un total de 45 péptidos 9-meros de MUM superpuestos que cubren la secuencia de AA de la proteína Exon18\_MUM truncada (tabla 2).

**Tabla 2:** Secuencias de péptidos 9-meros superpuestos de la proteína NCAM Exon18\_MUM

|    |           |    |           |
|----|-----------|----|-----------|
| 23 | PLVDLSDTP | 46 | TQPGAAKSP |
| 24 | LSDTPTSTP | 47 | AAKSPAEEA |
| 25 | PTSTPAASN | 48 | PAEAATALA |
| 26 | PAASNLSST | 49 | ATALASPKS |
| 27 | NLSSSVLAN | 50 | ASPKSEAAS |
| 28 | SVLANQGAV | 51 | SEAASVSTT |
| 29 | NQGAVLSPS | 52 | SVSTTNPSQ |
| 30 | VLSPSAPAG | 53 | TNPSQGEDF |
| 31 | SAPAGVGEA | 54 | QGEDFKMDE |
| 32 | GVGEASKAP | 55 | FKMDEGNFK |
| 33 | ASKAPPASK | 56 | EGNFKTPDI |
| 34 | PPASKPTPA | 57 | KTPDIDLAK |
| 35 | KPTPAPVPT | 58 | IDLAKDVFA |
| 36 | APVPTPTGA | 59 | KDVFAALGS |
| 37 | TPTGAASPL | 60 | AALGSPAPA |
| 38 | AASPLAAAA | 61 | SPAPAAGAS |
| 39 | LAAAAPAT  | 62 | AAGASGQAP |
| 40 | AAPATEAPQ | 63 | SGQAPELAP |
| 41 | TEAPQAKQE | 64 | PELAPSTAD |
| 42 | QAKQEAPST | 65 | PSTADSSVS |
| 43 | EAPSTKGPD | 66 | DSSVSPAPA |
| 44 | TKGPDPEPT |    |           |
| 45 | DPEPTQPGA |    |           |

Para cada péptido la re-estimulación se realizó en 5-veces. Las células se permeabilizaron, fijaron y tiñeron para IFN- $\gamma$  intracelular y CD8 expresado en la superficie por medio del uso de anticuerpos marcados fluorescentes. El número de células que contienen IFN- $\gamma$  intracelular por  $10^5$  células CD8 positivas se midió por análisis de FACS.

5

Los resultados se muestran en la **Figura 5**.

Se encontró que la inmunización con la proteína Exon18\_MUM truncada indujo células-T citotóxicas específicas por MUM como se mostró por la re-estimulación *in vitro* con el péptido 26-27, el péptido 30-32, el péptido 40-42, el péptido 45-47 y el péptido 55 -58 (**Figura 5**). Es interesante que, estos datos muestran que algunas regiones específicas de la proteína recombinante truncada MUM son epítomos de CTL potenciales. Además, estos datos confirman que la proteína MUM truncada es altamente inmunogénica incluso sin Abisco-100 como se encontró en el experimento de inmunización. Adicionalmente, los ratones también se inmunizaron con ADN de plásmido de NCAM Exon18\_MUM. Como se muestra en la **Figura 6A** la inmunización con ADN indujo una alta respuesta de CTL específica por MUM. La re-estimulación *in vitro* con el péptido 25-28, el péptido 30-32, el péptido 40-44, el péptido 45-47, el péptido 52-54, el péptido 62 y el péptido 65 mostró claramente que se indujeron células-T citotóxicas específicas por MUM tras la inmunización de los animales con el ADN de Exon18\_MUM. Cuando se compara con los epítomos de CTL a partir de los ratones inmunizados con la proteína, los péptidos 26-27, 30-32, 40-42, 45-47 y el péptido 65 además se encontraron en los animales inmunizados con ADN. Estos datos muestran que se inducen células-T citotóxicas contra algunos de estos epítomos en animales tras ambas la inmunización con ADN y proteínas

A continuación, los epítomos de CTL como se encuentran en la inmunización con el ADN de Exon18\_MUM y la proteína Exon18\_MUM, se compararon con los epítomos de CTL previstos por el software SYPHEITI. Este software se usó para prever la puntuación para todos los péptidos 9-meros para el haplotipo H2-D<sup>d/d</sup>, el haplotipo MHC de los ratones Balb /c. Para todos los péptidos 9-meros que se usaron en la re-estimulación *in vitro* se predijo una puntuación, estas puntuaciones se representan en la **Figura 6B**. Algunos de los péptidos previstos como posibles epítomos de CTL, lo cual significa que estos péptidos tienen el potencial de re-estimular *in vitro* la correspondiente célula T citotóxica inducida *in vivo*, se confirmaron claramente en nuestros experimentos en ratones. Los datos muestran que la re-estimulación *in vitro* de linfocitos aislados a partir de ratones inmunizados con Exon18\_MUM, con cualquiera de los péptidos 31, 53 y 56, eficazmente resulta en la re-estimulación de estas células-T CD8 positivas inducidas *in vivo* en ratones.

#### D. ELISA de NCAM Exon18\_MUM

Se realizó un ELISA de NCAM Exon18\_MUM como sigue. Las placas ELISA se recubrieron con proteínas Exon18\_MUM NCAM etiquetadas con His (de longitud completa o truncada) y se bloquearon con leche descremada seca (2%). Se añadieron los sueros de ratones inmunizados con la proteína NCAM Exon18\_MUM diluidos en serie. Los anticuerpos específicos por MUM que se indujeron tras la inmunización se unieron específicamente a la proteína Exon18\_MUM en las placas recubiertas. La especificidad de los anticuerpos se confirmó mediante la detección de la unión de los anticuerpos a una placa recubierta con una proteína control negativa etiquetada con His que también se produjo en *E. coli*. Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante. La enzima conjugada oxida el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la DO del producto oxidado se midió a 450 nm de acuerdo a procedimientos estándar.

#### 45 **D1. La inmunización con NCAM Exon18\_MUM induce respuestas inmunes humorales**

Se midieron los títulos de anticuerpos en el suero de ratones Balb /c inmunizados con la proteína de NCAM Exon18\_MUM y/o ADN de plásmido de Exon18\_MUM. Los animales inmunizados con la proteína Exon18\_MUM truncada ambos en PBS o en adyuvante Abisco-100, desarrollaron títulos de anticuerpos específicos anti-MUM en el suero, como se muestra en la **Figura 7 grupo C y D** (barras oscuras). No se mostró unión de los anticuerpos del suero cuando se realizó el ELISA con placas recubiertas con la proteína control negativo etiquetada con His que también se produjo en *E. coli* (**Figura 7 grupo C y D (barras grises)**). Estos datos muestran que no se produjeron anticuerpos anti-histidina o anticuerpos contra proteínas vinculadas a *E. coli* en el suero de los animales inmunizados. La inmunización con el plásmido que codifica el ADN de NCAM Exon18\_MUM no indujo títulos de anticuerpos en el suero. Solamente cuando los ratones inmunizados con ADN se reforzaron con la proteína formulada NCAM Exon18\_MUM se encontró una clara inducción de títulos de anticuerpos anti-MUM (**Figura 7 grupo F y G**). Nuestros datos muestran claramente que la inmunización de ratones con la proteína NCAM Exon18\_MUM truncada induce una significativa respuesta inmune humoral específica por MUM.

## **D2. Elisa basado en la proteína Exon18\_MUM de longitud completa versus la proteína Exon18\_MUM truncada.**

5 Se midieron los títulos de anticuerpos en el suero de ratones inmunizados con la proteína Exon18\_MUM truncada. El suero se obtuvo a partir de un total de 45 animales inmunizados con proteína Exon18\_MUM truncada y 5 ratones inmunizados con el vector pCI vacío. Se compararon las respuestas inmunes humorales como se detectaron en las placas de ELISA recubiertas con las proteínas recombinantes Exon18\_MUM de longitud completa y Exon18\_MUM truncada (**Figura 8**).

10 Como se muestra en la **Figura 8**, no se encontraron diferencias significativas en la detección de anticuerpos específicos por MUM en los sueros de los animales inmunizados si el recubrimiento se realizó con la proteína Exon18\_MUM de longitud completa o truncada. Estos datos muestran que cuando se recubre con la proteína Exon18\_MUM completa todos los epítomos como se exponen en la Exon18\_MUM todavía están disponibles.

## **15 E. Producción de anticuerpos monoclonales anti-MUM**

Los ratones se inmunizaron/reforzaron con la proteína NCAM Exon18\_MUM truncada de acuerdo con procedimientos estándar. Las células del bazo se fusionaron con células de mieloma NS0. Las células fusionadas se sembraron en medio de selección HAT de acuerdo con procedimientos estándar. Los clones viables se seleccionaron y el anticuerpo secretado subsecuentemente se detectó en células que expresan NCAM Exon18\_MUM al seguir procedimientos inmunocitoquímicos estándar. Los anticuerpos monoclonales obtenidos se detectaron en células H69 y H82 positivas para NCAM Exon18\_MUM. Finalmente, se seleccionó un clon, este clon de hibridoma produce un anticuerpo monoclonal que muestra la tinción tipo-NCAM en las líneas celulares H69 y H82 que expresan NCAM Exon18\_MUM en tinción inmunocitoquímica. Se usaron anticuerpos de cabra contra IgG de ratón marcados con Alexa Fluor como anticuerpo secundario y se realizó la visualización por microscopía de fluorescencia (**Figura 9**). La selección adicional del clon (MUMI 21 B2) se basó en la ausencia de tinción en las células HCT-116 negativas para NCAM Exon18\_MUM. Además, la tinción de MUMI 21 B2 mostró una localización adecuada, en las regiones de contacto célula-célula, como se muestra por formación de imágenes confocales (**Figura 10**). Para estos experimentos se usaron anticuerpos que se enriquecieron por medio del uso de la producción en un biorreactor MiniPerm.

En resumen, el anticuerpo monoclonal anti-MUM (MUMI 21 B2) que muestra una tinción de tipo NCAM en células que expresan NCAM Exon18\_MUM, y no en las células HCT-116 negativas para NCAM Exon18\_MUM.

## **35 Experimentos para validar el potencial inmunogénico de NCAM 180 y Exon18\_MUM como un antígeno candidato**

### **Se realiza un experimento con animales en el cual**

40 1) Se validó el potencial inmunogénico de células que expresan la proteína NCAM-180 o la proteína Exon18\_MUM usada como una vacuna de célula entera para el tratamiento de tumores que expresan NCAM-180. Los ratones se vacunaron con células RVIK (H-2k no coincidencia de MHC), que expresan NCAM-180 de tamaño completo o el Exon18\_MUM irradiadas con 200Gy, que se usaron como una vacuna de células enteras. Los tumores que expresan la proteína de NCAM-180 se inducen en ratones por la inyección de células Renca (H-2b coincidencia de MHC) transfectadas establemente que expresan el antígeno. La eficiencia de la protección e inmunización de las células que expresan NCAM-180 y Exon18\_MUM que se usan como una vacuna de células enteras se evalúa en base al volumen del tumor y la supervivencia de los ratones. Se determinan respuestas de CTL y anticuerpos respectivamente en las células del bazo (aisladas en la semana 9) y muestras de sangre (tomada al inicio del estudio y después de las semanas 3, 5 y 7).

50 2) se validó el potencial inmunogénico de un constructo de ADN que codifica el Exon18\_MUM que se usó como una vacuna de ADN para el tratamiento de tumores que expresan NCAM-180. Los ratones se vacunan con una construcción de ADN que codifica el Exon18\_MUM, usado como vacuna de ADN. Los tumores que expresan la proteína NCAM-180 se inducen en ratones por medio del uso de células Renca (H-2b coincidencia de MHC) transfectadas establemente que expresan el antígeno. La eficiencia de la protección/inmunización de un constructo de vacuna de ADN que codifica la Exon18\_MUM se evalúa en base al volumen del tumor y la supervivencia de los ratones. Las respuestas de CTL y anticuerpos se prueban respectivamente en células de bazo (aisladas en la semana 9) y muestras de sangre (tomadas al inicio del estudio y después de las semanas 3, 5 y 7).

60 3) se validó el potencial inmunogénico de la proteína Exon18\_MUM, que se usó como una vacuna de proteína para el tratamiento de tumores que expresan NCAM-180.

Los ratones se vacunaron con la proteína Exon18\_MUM, que se usó como una vacuna de proteína. Los tumores que expresan la proteína de NCAM-180 se inducen en ratones por la inyección de células Renca (H-2b coincidencia

de MHC) transfectadas establemente que expresan el antígeno. La eficiencia de la protección/inmunización de la proteína Exon18\_MUM se evalúa en base al volumen del tumor y la supervivencia de los ratones. Las respuestas de CTL y anticuerpos se prueban respectivamente en células de bazo (aisladas en la semana 9) y muestras de sangre (tomadas al inicio del estudio y después de la semanas 3, 5 y 7).

5

**Perspectiva de las vacunaciones para evaluar el efecto in vivo de**

o Células que expresan NCAM180 y Exon18\_MUM como una vacuna de células enteras.

o ADN de Exon18\_MUM como una vacuna de ADN

10 o Proteína Exon18\_MUM como una vacuna de proteína

| <i>Balb/c (H-2d)</i>  | <i>Vacunación con ...</i> | <i>Tumor inducido con</i> | <i>Expectativas</i>                                                                                | <i>Proporciona información acerca de</i>                                                                    |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Grupo_a (N=10)</i> | <i>solución salina</i>    | <i>Renca + NCAM-180</i>   | <i>Crecimiento del tumor, sin protección. 0% sobrevida</i>                                         | - <i>La inducibilidad de un tumor Renca con (NCAM-180 (vacuna blanco)</i>                                   |
| <i>Grupo_b (N=10)</i> | <i>Renca + NCAM-180</i>   | <i>Renca + NCAM-180</i>   | <i>100% protección = 100% sobrevida</i>                                                            | - <i>Inmunización con vacuna de células enteras</i>                                                         |
|                       |                           |                           | <i>Sin crecimiento tumoral</i>                                                                     | - <i>Ninguna información acerca de la relevancia de NCAM. (control positivo de vacunación)</i>              |
| <i>Grupo_c (N=10)</i> | <i>RVIK + NCAM 180</i>    | <i>Renca + NCAM-180</i>   | <i>Protección? Crecimiento tumoral reducido ?</i>                                                  | - <i>Una vacuna de células enteras con NCAM-180 o Exon18 MUM solos como inmunógeno</i>                      |
| <i>Grupo_d (N=10)</i> | <i>RVIK+ 18MUM</i>        | <i>Renca + NCAM-180</i>   | <i>Protección ? Comparación con el potencial inmunogénico de NCAM-180+pi.</i>                      | - <i>Reduce el crecimiento tumoral para tumores que expresan NCAM-180.</i>                                  |
|                       |                           |                           |                                                                                                    | - <i>La respuesta inmune celular o humoral</i>                                                              |
| <i>Balb/c (H-2d)</i>  | <i>Vacunación con ...</i> | <i>Tumor inducido con</i> | <i>Expectativas</i>                                                                                | <i>Proporciona información acerca de</i>                                                                    |
|                       |                           |                           |                                                                                                    | <i>respuesta.</i>                                                                                           |
| <i>Grupo_e (N=10)</i> | <i>RVIK</i>               | <i>Renca+ NCAM-180</i>    | <i>Sin protección</i>                                                                              | - <i>La actividad protectora de las células parentales RVIK</i>                                             |
| <i>Grupo_g (N=10)</i> | <i>Proteína 18MUM</i>     | <i>Renca + NCAM-180</i>   | <i>Protección? Volumen tumoral reducido después de la inmunización con la proteína Exon18-MUM.</i> | - <i>La vacuna basada en la proteína Exon18_MUM protege del crecimiento del tumor que expresa NCAM-180.</i> |

• Este modelo enfatiza que la proteína NCAM 180 o la proteína Exon18\_MUM son antígenos potenciales a usar en el desarrollo de vacunas. Adicionalmente, se compara con este modelo *in vivo* el potencial inmunogénico de Exon18\_MUM usado como una vacuna de células enteras, una vacuna de ADN o una vacuna basada en proteína.

15

Para cada grupo:

• La inmunización se realiza con 100 µl (10<sup>6</sup> células (RVIK), irradiadas con 200 Gy o 50 µg de ADN) o 100 µg de proteína en 30µl. La vacunación se hará tres veces con tiempo intermedio de una semana.

20

• El tumor se induce con 100µl (10<sup>5</sup> células (Renca)) que expresan NCAM-180. Esta inmunización se hace una semana después de la última vacunación, y se realiza sólo una vez

• El crecimiento tumoral se mide ambos horizontal y vertical.

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> MUbio Products BV
- <120> Vacuna contra el cáncer
- 5 <130> MUB-001
- <150>EP06447035.4
- <151> 2006-03-13
- <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210>1
- <211>813
- <212>ADN
- <213> Homo Sapiens
- <220>
- 15 <221>CDS
- <222>(1)..(813)
- <223>
- <400>1
- ctgcctgccg acactacggc cactgtcgag gacatgctgc cttctgtcac caccgtcacc
- actaactctg acactatcac cgaaaccttt gccactgctc agaacagccc caccagtgag
- accaccaccc tgacctccag tattgccccg ccggccacgg ccacgctga ctcaaactct
- gtaccggctg gccaggccac cccttccaag gggcccagcg cctctgcccc ctccccggcc
- ccagcttcag cccccaaggt cgccccctc gttgacctga gcgacacccc gacctcaacc
- cctgccgcta gcaatttgc ttctagtgtc ctggctaacc aaggggctgt cctcagccca
- agcgccccg ctgggtgtcg ggaggctct aaggtctctc cggccagcaa gccaccccc
- gcaccagtcc ccaccccgac tggggcagcc agtcctctag cagcagcggc tgccccctgcc
- acagaagccc ctcaggccaa gcaggaggct cccagcacca aaggcccgga cccggagccc
- accagcccg gagccgcgaa gagcccggcc gaggcagcca cagcccttgc tagcccgaag
- agcgaggctg cctccgtcag caccacaaac ccttcccagg gcgaggactt taaaatggac
- gaagggaaact tcaagacccc agatattgac cttgcaaagg atgtttttgc agccctgggc
- tctcctgctc ccgcccgtgg ggccagtgga caagcccctg agcttgctcc ttccactgca
- gacagctctg ttctgcctgc gccagcaaag acg
- 20 <210>2
- <211>271
- <212>PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400>2
- LPADTTATVE DMLPSVTVT TNSDTITETF ATAQNSPTSE TTTLTSSIAP
- PATATPDSNS VPAGQATPSK GPSASAPSPA PASAPKVAPL VDLSDTPTST
- PAASNLSSSV LANQGAVLSP SAPAGVGEAS KAPPASKPTP APVPTPTGAA
- SPLAAAAAPA TEAPQARQEA PSTKGPDPEP TQPGAASKSPA EAATALASPK
- SEAASVSTTN PSQGEDFKMD EGNEKTPDID LAKDVFAALG SPAPAAGASG
- 25 QAPELAPSTA DSSVSPAPAK T
- <210>3
- <211>3588
- <212>ADN
- <213> Homo Sapiens

<400>3

|             |             |            |             |             |             |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gaattcgagg  | atccgggtac  | catggcgcgt | gaacgcagct  | cggtcgccgc  | tggcaggaaa  | 60   |
| caattctgca  | aaaataatca  | tactcagcct | ggcaattgtc  | tgccctaggg  | tctgtcgcctc | 120  |
| agccgcccgtc | cacactcgc   | gcaggggggg | gggcacagaa  | tttaccgcgg  | caagaacatc  | 180  |
| cctcccagcc  | agcagattac  | aatgctgcaa | actaaggatc  | tcactctggac | tttgtttttc  | 240  |
| ctgggaactg  | cagttttctc  | gcaggtggat | attgttccca  | gccaggggga  | gatcagcgtt  | 300  |
| ggagagtcca  | aattcttctt  | atgccaaagt | gcagggagatg | ccaaagataa  | agacatctcc  | 360  |
| tggtttcccc  | ccaatggaga  | aaagctcacc | ccaaaccagc  | agcggatctc  | agtgggtggy  | 420  |
| aatgatgatt  | cctcctccac  | cctcaccatc | tataacgcca  | acatcgacga  | cgccggcat   | 480  |
| tacaagtgtg  | tggttacagg  | cgaggatggc | agtgatgcag  | aggccaccgt  | caacgtgaag  | 540  |
| atctttcaga  | agctcatggt  | caagaatgcg | ccaaccccac  | aggagtccg   | ggaggggaa   | 600  |
| gatgccgtga  | ttgtgtgtga  | tgtggtcagc | tccctcccac  | caaccatcat  | ctggaaacac  | 660  |
| aaagggccag  | atgtcatcct  | gaaaaaagat | gtccgattca  | tagtctgtc   | caacaactac  | 720  |
| ctgcagatcc  | ggggcatcaa  | gaaaacagat | gagggcactt  | atcgcctgtga | gggcagaatc  | 780  |
| ctggcacggg  | gggagatcaa  | cttcaaggac | attcaggtca  | ttgtgaatgt  | gccacctacc  | 840  |
| atccaggcca  | ggcagaatat  | tgtgaatgcc | accgccaacc  | tcggccagtc  | cgtaaccctg  | 900  |
| gtgtgcatg   | ccgaagcctt  | cccagagccc | accatgagct  | ggcaaaagga  | tggggaacag  | 960  |
| atagagcaag  | aggaagacga  | tgagaagtac | atcttcagcg  | acgatagttc  | ccagctgacc  | 1020 |
| atcaaaaagg  | tggataagaa  | cgacgaggct | gagtacatct  | gcattgctga  | gaacaaggct  | 1080 |
| ggcgagcagg  | atgcgaccat  | ccacctcaaa | gtctttgcaa  | aacccaaaat  | cacataatgta | 1140 |
| gagaaccaga  | ctgccatgga  | attagaggag | caggtcactc  | ttacctgtga  | agcctccgga  | 1200 |
| gaccccatte  | cctccatcac  | ctggaggact | tctacccgga  | acatcagcag  | cgaagaaaag  | 1260 |
| gcttcgttga  | ctgcaccaga  | gaagcaagag | actctggatg  | ggcacatggt  | ggtgcgtagc  | 1320 |
| catgcccgtg  | tgtcgtcgtc  | gacctgaag  | agcattccag  | acactgatgc  | cggaagatc   | 1380 |
| atctgcaccg  | ccagcaaacac | catcggccag | gactcccagt  | ccatgtacct  | tgaagtgcaa  | 1440 |
| tatgccccaa  | agctacaggg  | ccctgtggct | gtgtacactt  | gggaggggaa  | ccaggtgaac  | 1500 |
| atcacctgcg  | aggtatttgc  | ctatcccagt | gccacgatct  | catggtttcg  | ggatggccag  | 1560 |
| ctgctgccaa  | gctccaatta  | cagcaatate | aagatctaca  | acaccccctc  | tgccagctat  | 1620 |
| ctggagggtga | cccagactc   | tgagaatgat | tttgggaact  | acaactgtac  | tgcagtgaac  | 1680 |
| cgcatggggc  | aggagtctct  | ggaattcatc | cttgttcaag  | cagacacccc  | ctcttcacca  | 1740 |
| tcatecgacc  | agggtggagcc | atactccagc | acagcccagg  | tgcaqtttga  | tgaaccagag  | 1800 |
| gccacaggtg  | gggtgcccat  | cctcaaatc  | aaagctgagt  | ggagagcagt  | tggtagaaga  | 1860 |
| gtatggcatt  | ccaagtggta  | tgatgccaa  | gaagccagca  | tggagggcat  | cgtaaccatc  | 1920 |
| gtgggctgga  | agcccgaaac  | aacgtacgce | gtaaggctgg  | cgccgctcaa  | tggcaaaagg  | 1980 |
| ctgggtgaga  | tcagcggcgc  | ctcggatctc | aagacgcagc  | cagtccaagg  | ggaacccagt  | 2040 |
| gcacctaaag  | tcgaagggca  | gatgggagag | gatggaaact  | ctatataaag  | gaacctgatc  | 2100 |
| aagcaggatg  | acgggggctc  | ccccatcaga | cactatctgg  | tcaggtaccg  | agcgtctctc  | 2160 |
| tccgagtgga  | aaccagagat  | caggctccc  | tctggcagtg  | accacgtcat  | gctgaagtcc  | 2220 |
| ctggactgga  | atgctgagta  | tgaggcttac | gtggtggctg  | agaaccagca  | aggaaaatcc  | 2280 |
| aagggcgtc   | atlttgtggt  | caggacctcg | gcccagccca  | cagccatccc  | agccaacggc  | 2340 |
| agccccacct  | caggcctgag  | caccggggcc | atcgtgggca  | tcctcatcgt  | catcttcgtc  | 2400 |
| ctgctcctgg  | tggttgtgga  | catcacctgc | tacttcctga  | acaagtgtgg  | cctgttcattg | 2460 |
| tgcatgctgg  | tcaacctgtg  | tggaaaagcc | gggcccgggg  | ccaagggcaa  | ggacatggag  | 2520 |
| gagggcaagg  | ccgcttctc   | gaaagatgag | tccaaggagc  | ccatcgtgga  | ggttcgaaacg | 2580 |

|            |             |            |             |            |             |      |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| gagggagaga | ggacccccaa  | ccatgatgga | gggaaacaca  | cagagcccaa | cgagaccacg  | 2640 |
| ccactgacgg | agcccagact  | gcctgcccag | actacggcca  | ctgtcgagga | catgctgcct  | 2700 |
| tctgtcacea | ccgtcaccac  | taactctgac | actatccagg  | aaacctttgc | cactgctcag  | 2760 |
| aacagcccca | ccagtgagac  | caccacccgt | acctccagta  | ttgcccggcc | ggccacggcc  | 2820 |
| acgctgact  | caaaactctgt | accggctggc | caggccacc   | cttccaaggg | gccagcgcc   | 2880 |
| tctgcccct  | cccggcccc   | agcttcagcc | cccaaggctc  | ccccctcgt  | tgacctgagc  | 2940 |
| gacaccccga | cctcaacccc  | tgccgctagc | aatttgtctt  | ctagtgtcct | ggctaaacca  | 3000 |
| ggggctgtcc | tcagcccaag  | cgcccctgct | ggtgtcgggg  | aggcctctaa | ggctcctccg  | 3060 |
| gccagcaagc | ccacccctgc  | accagtcccc | accccgactg  | gggagccag  | tcctctagca  | 3120 |
| gcagcggctg | cccctgccac  | agaagcccct | caggccaagc  | aggaggctcc | cagcaccaaa  | 3180 |
| ggcccggacc | cggagcccac  | ccagcccgga | gccgcgaaga  | gcccggccga | ggcagccaca  | 3240 |
| gcccttgcta | gcccgaagag  | cgaggctgcc | tccgtcagca  | ccacaaccc  | ttcccagggc  | 3300 |
| gaggaattta | aaatggagca  | agggaaactt | aagaacccag  | atattgacct | tgcaaaaggat | 3360 |
| gtttttgag  | ccctgggctc  | tcctgctccc | gccgctgggg  | ccagtgagca | agccccagag  | 3420 |
| cttgcctcct | ccactgcaga  | cagctctggt | tcgctgcgc   | cagcaaaagc | gaagggcccc  | 3480 |
| gtagaagcaa | agccagagtg  | ccaggagaca | gaaacgaaagc | cagcggcagc | cgaagtcaag  | 3540 |
| acggtcccca | atgacgccac  | acagacaaag | gagaacgaga  | gcaaaagca  |             | 3588 |

5

<210>4

<211>1186

<212>PRT

<213> Homo Sapiens

<400>4

|            |            |             |            |            |             |      |
|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| EFEDPGTMAR | ERSSAAAGRK | QFCKNNHTQP  | GNCLPLGLSL | SRRPHSLQCG | CHRIYRGKNI  | 60   |
| PPSQQITMLQ | TKDLIWLTFP | LGTAVSLQVD  | IVPSQGEISV | GESKFFLCQV | AGDARDKDIS  | 120  |
| WFSPNGEKL  | PNQQRISVVV | NDDSSSLTI   | YNANIDDAGI | YKCVVTGEDG | SESEATVNVK  | 180  |
| IFQKLMFKNA | PTPQEFREGE | DAVIVCDVVS  | SLPPTIIWKH | KGRDVIKLD  | VRFIVLSNNY  | 240  |
| LQIRGIKKT  | EGTYRCEGRI | LARGEINFKD  | IQVIVNVVPT | IQARQNVVNA | TANLQGSVTL  | 300  |
| VCDAEGFPEP | TMSWTRDGEQ | IEQEEDDEKY  | IFSDSSQLT  | IKKVDKNDKA | EYICIAENKA  | 360  |
| GEQDATIHLK | VFAKPKITYV | ENQPTAMELEE | QVTLTCEASG | DPIPSITWRT | STRNISSEEK  | 420  |
| TLDGHMVVRS | HARVSSLTLK | SIQYTDAGEY  | ICTASNTIGQ | DSQSMYLEVQ | YAPKLGQGPVA | 480  |
| VYTWEGNQVN | ITCEVFAYPS | ATISWFRDQG  | LLPSSNYSNI | KIYNTPSASY | LEVTPDSEND  | 540  |
| FGNYNCTAVN | RIGQESLEFI | LVQADTPSSP  | SIDQVEPYSS | TAQVQFDEPE | ATGGVPIILKY | 600  |
| KAEWRAVGEE | VWHSKWYDAK | EASMEGIVTI  | VGLKPEPTYA | VRLAALNGKG | LGEISAASEF  | 660  |
| KTQPVGEP   | APKLEQMG   | DGNSIKVNL   | KQDDGGSP   | HYLVRYRALS | SEWKPEIRLP  | 720  |
| SGSDEHMLKS | LDWNAEYEVY | VVAENQQGKS  | KAHFVFRS   | AQPTAIPANG | SPTSGLSTGA  | 780  |
| IVGILIVIFV | LLLVVVDITC | YFLNKCGLFM  | CIAVNLGCKA | GPGARGKDME | EGKAAFSDKE  | 840  |
| SKEPIVEVRT | EEERTPNHDG | GKHTPEPNETT | PLTEPELPA  | TTATVEDMLP | SVTTVTNSD   | 900  |
| TIETEFATAQ | NSPTSETTTL | TSSIAPPATA  | TPDSNSVPAG | QATPSKGPSA | SAPSPAPASA  | 960  |
| PKVAPLVDL  | DTPSTPAAS  | NLSSSVLANQ  | GAVLSFSA   | GVGEASKAPP | ASKPTPAPVP  | 1020 |
| TPTGAASPLA | AAAAPATEAP | QAKQEAPSTK  | GPDPPTQPG  | AAKSPAEAA  | ALASPKSEAA  | 1080 |
| SVSTTNP    | EDFNMDEGNF | KTPDIDLAKD  | VFAALGSPAP | AAGASGQAPE | LAPSTADSSV  | 1140 |
| SPAPAKTKGP | VEAKPEQET  | ETKPAPAEVK  | TVPNDATQTK | ENESKA     |             | 1186 |

<210>5

<211>372

5

<212>ADN

<213> Homo Sapiens

<400>5

|             |            |            |            |            |            |     |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gccgctagca  | atttgtcttc | tagtgcctcg | gctaaccaag | gggctgtcct | cagcccaagc | 60  |
| gccctctgctg | gtgtcgggga | ggcctctaag | gctcctcccg | ccagcaagcc | caccctgca  | 120 |
| ccagtcceca  | cccgcactgg | ggcagccagt | cctctagcag | cagcggtctg | ccctgccaca | 180 |
| gaagcccctc  | aggccaagca | ggaggtctcc | agcaccaaag | gcccggacc  | ggagcccacc | 240 |

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| cagcccggag | ccgcgaagag | cccggccgag | gcagccacag | cccttgctag | cccgaagagc | 300 |
| gaggtgcct  | ccgtcagcac | cacaaacct  | tcccagggcg | aggacttta  | aatggacgaa | 360 |
| gggaacttca | ag         |            |            |            |            |     |

10

<210>6

<211>124

<212>PRT

<213> Homo Sapiens

15

<400>6

|         |         |            |            |            |            |     |
|---------|---------|------------|------------|------------|------------|-----|
| AASNLSV | ANQAVLS | APAGVGEASK | APPASKPTPA | PVPTPTGAAS | PLAAAAAPAT | 60  |
| EAPQAKQ | EAPSTRG | PDPEPT     | QPGAAKSPA  | AATALASPKS | EAASVSTTNP | 120 |
| GNFK    |         |            |            |            |            | 124 |



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido que consiste en la sec. con  
núm. de ident.: 2, la sec. con núm. de ident.: 6 o un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 2 o la sec. con  
núm. de ident.: 6, en donde dicho fragmento es capaz de inducir una respuesta inmune humoral o celular  
en un mamífero y comprende un epítipo seleccionado de; PAASNLSSSVLAN (AA101-113 de la sec. con  
núm. de ident.: 2), VLSPSAPAGVG (AA 117-127 de la sec. con núm. de ident.: 2), LAAAAAPATEAPQ (AA  
153-165 de la sec. con núm. de ident.: 2), KGPDPEPTQPGA (AA 174-185 de la sec. con núm. de ident.: 2)  
10 y DFKMDEGNFK (AA 216-225 de la sec. con núm. de ident.: 2), y para el uso en el tratamiento o  
prevención del carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC).
- 15 2. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína aislada como se reivindica en la  
reivindicación 1 y que consiste en la sec. con núm. de ident.: 1 o la sec. con núm. de ident.: 5 para el uso en  
el tratamiento o prevención del carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC).
3. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 para el uso en  
el tratamiento o prevención del carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC).
- 20 4. Una célula huésped aislada que comprende, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la  
reivindicación 2, o un vector como se reivindica en la reivindicación 3 para el uso en el tratamiento o  
prevención del carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC).
- 25 5. Un anticuerpo que es inmunoespecífico para un polipéptido cualquiera de la reivindicación 1, para el uso en  
el tratamiento o prevención del carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC).
- 30 6. Una vacuna que contiene, una proteína como se reivindica en la reivindicación 1, o una molécula de ácido  
nucleico como se reivindica en la reivindicación 2, para el uso en el tratamiento o prevención del carcinoma  
de pulmón de células pequeñas (SCLC).
- 35 7. Un método in vitro para diagnosticar el carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) en un sujeto que  
comprende detectar o medir un producto del gen de la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM)-180  
en una muestra derivada a partir de dicho sujeto, en donde el producto del gen de NCAM-180 es:  
(a) un ARN correspondiente a la sec. con núm. de ident.: 1, o un ácido nucleico derivado de este;  
(b) un ARN correspondiente a la sec. con núm. de ident.: 3, o un ácido nucleico derivado de este;  
(c) una proteína que comprende la sec. con núm. de ident.: 2 ó 4;  
en que los niveles elevados del producto del gen NCAM-180 en comparación con una muestra no  
40 cancerosa o un valor estándar predeterminado para una muestra no cancerosa, indican una presencia  
de carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) en el sujeto.
- 45 8. El método de la reivindicación 7, en donde el producto del gen NCAM-180 es una proteína que tiene la sec.  
con núm. de ident.: 2 o la sec. con núm. de ident.: 6.
9. El método de la reivindicación 7, en donde un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a la sec. con  
núm. de ident.: 2, la sec. con núm. de ident.: 4, la sec. con núm. de ident.: 6 o a un fragmento de la sec. con  
núm. de ident.: 2 o de la sec. con núm. de ident.: 6, en donde dicho fragmento comprende de 5 a 30  
aminoácidos, más en particular a partir de 9 a 15 aminoácidos de una cualquiera de las sec. con núms. de  
ident.: 2, 4 ó 6; se usa para detectar o medir el producto del gen NCAM-180.
- 50 10. Una composición farmacéutica que comprende un producto del gen NCAM-180 purificado en una cantidad  
eficaz para provocar una respuesta inmune, en donde dicho producto del gen es:  
(i) un polipéptido aislado según la reivindicación 1, o  
(ii) molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 2,  
para usar en el tratamiento o prevención del carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC).

FIGURA 1

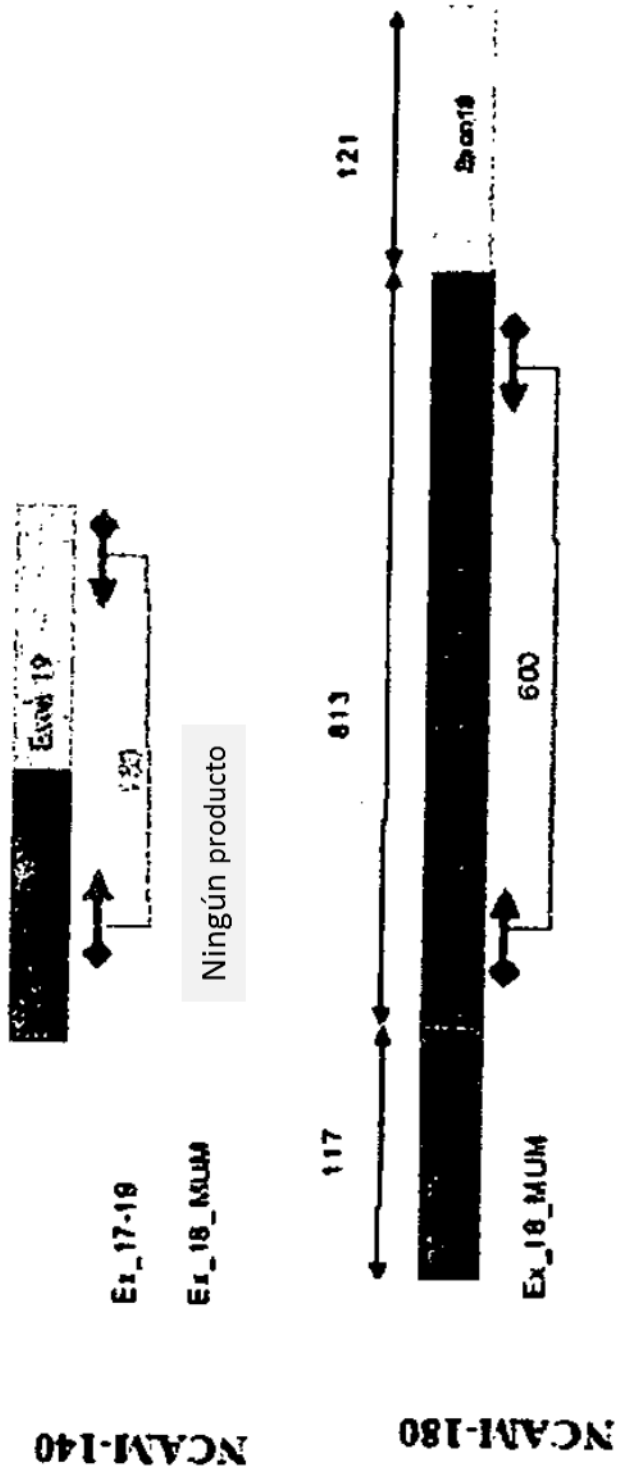


FIGURA 2

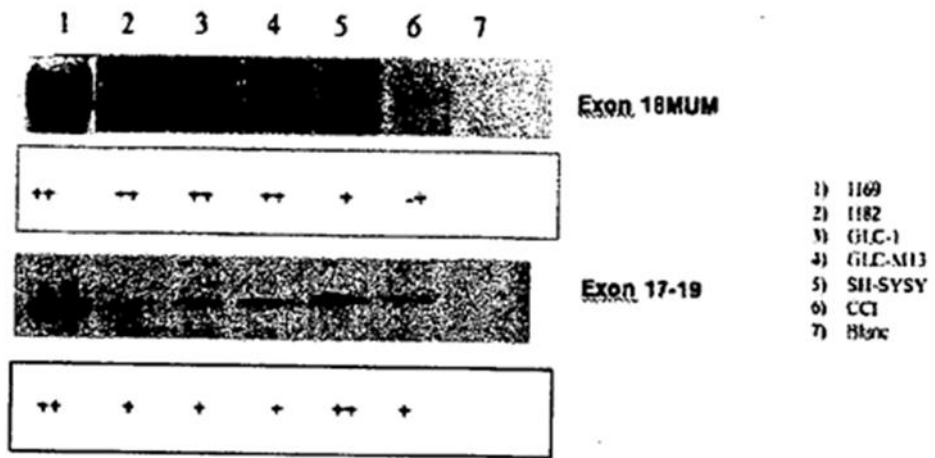


FIGURA 3

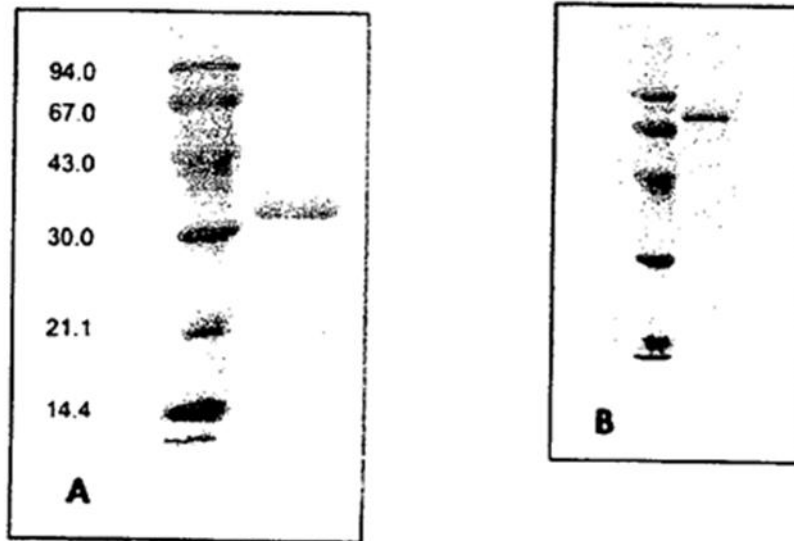


FIGURA 4

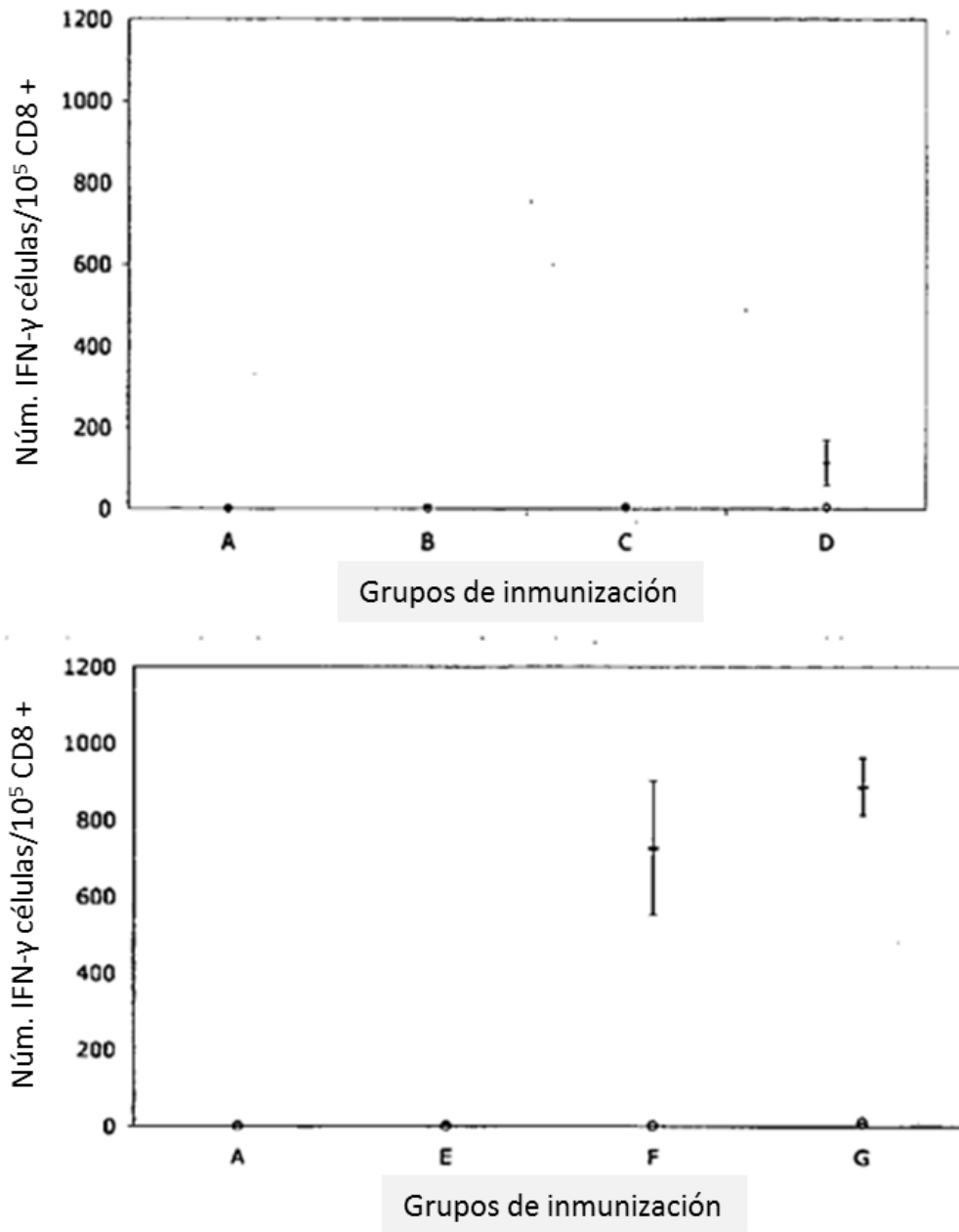


FIGURA 5

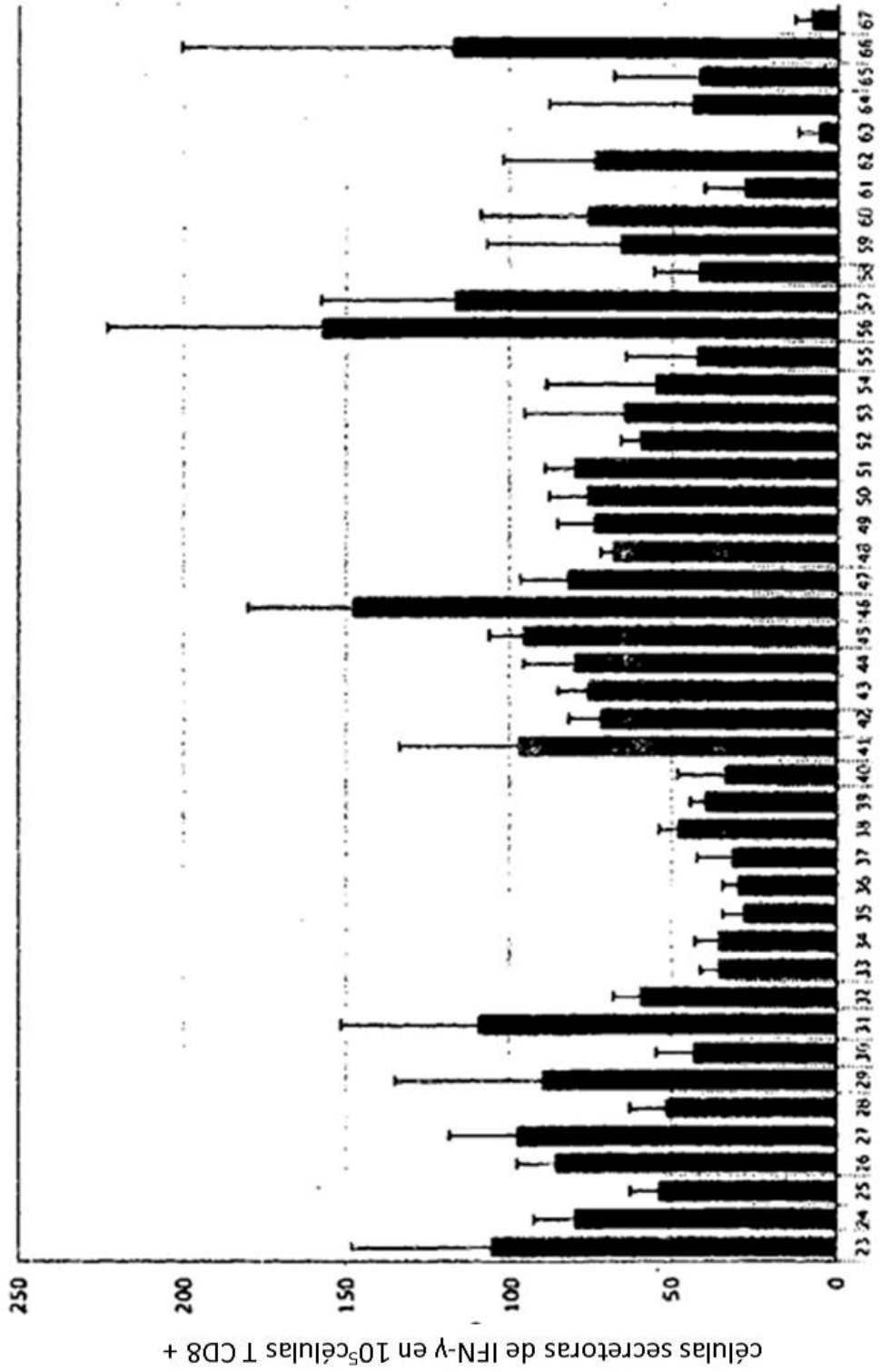


FIGURA 6 A

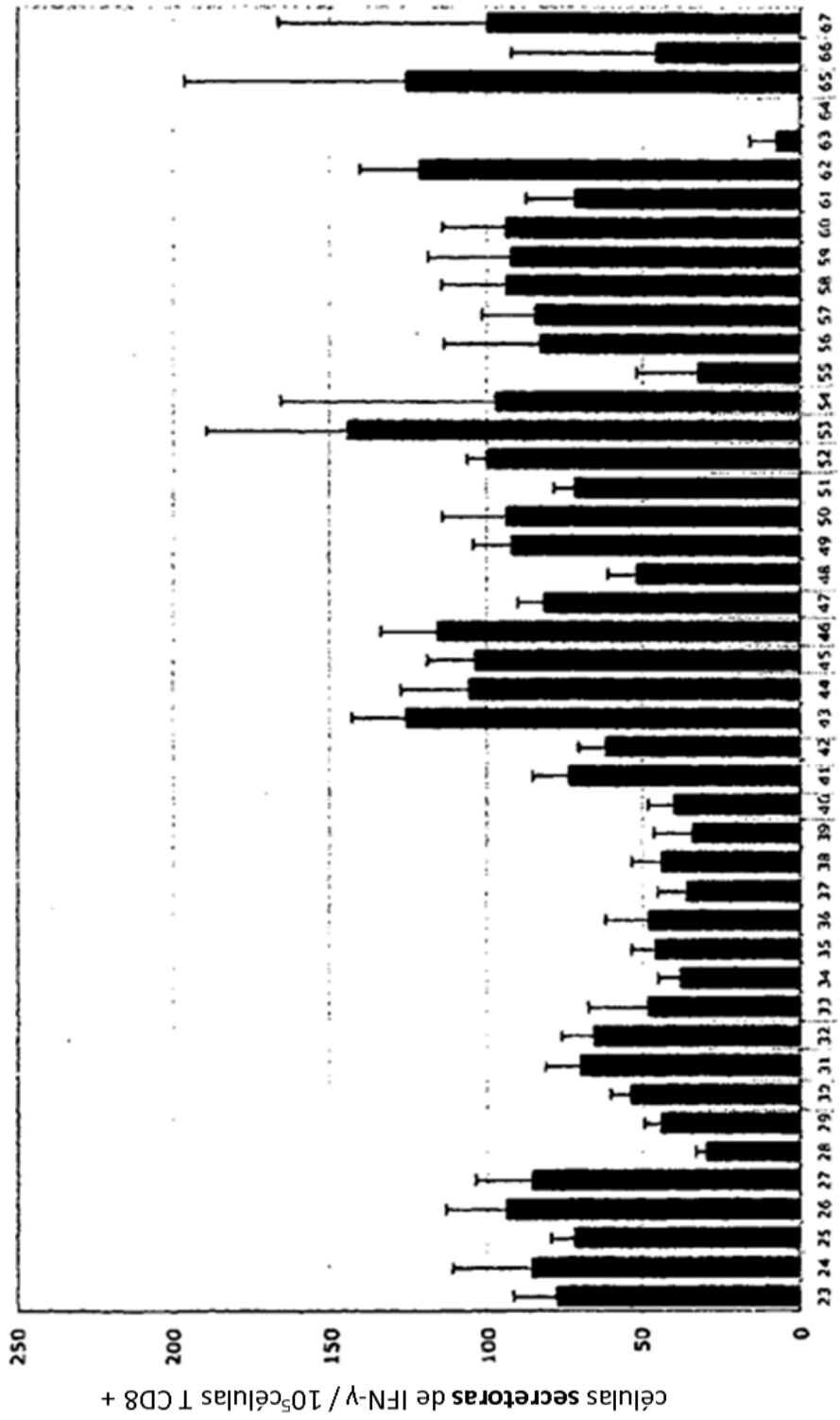


FIGURA 6 B

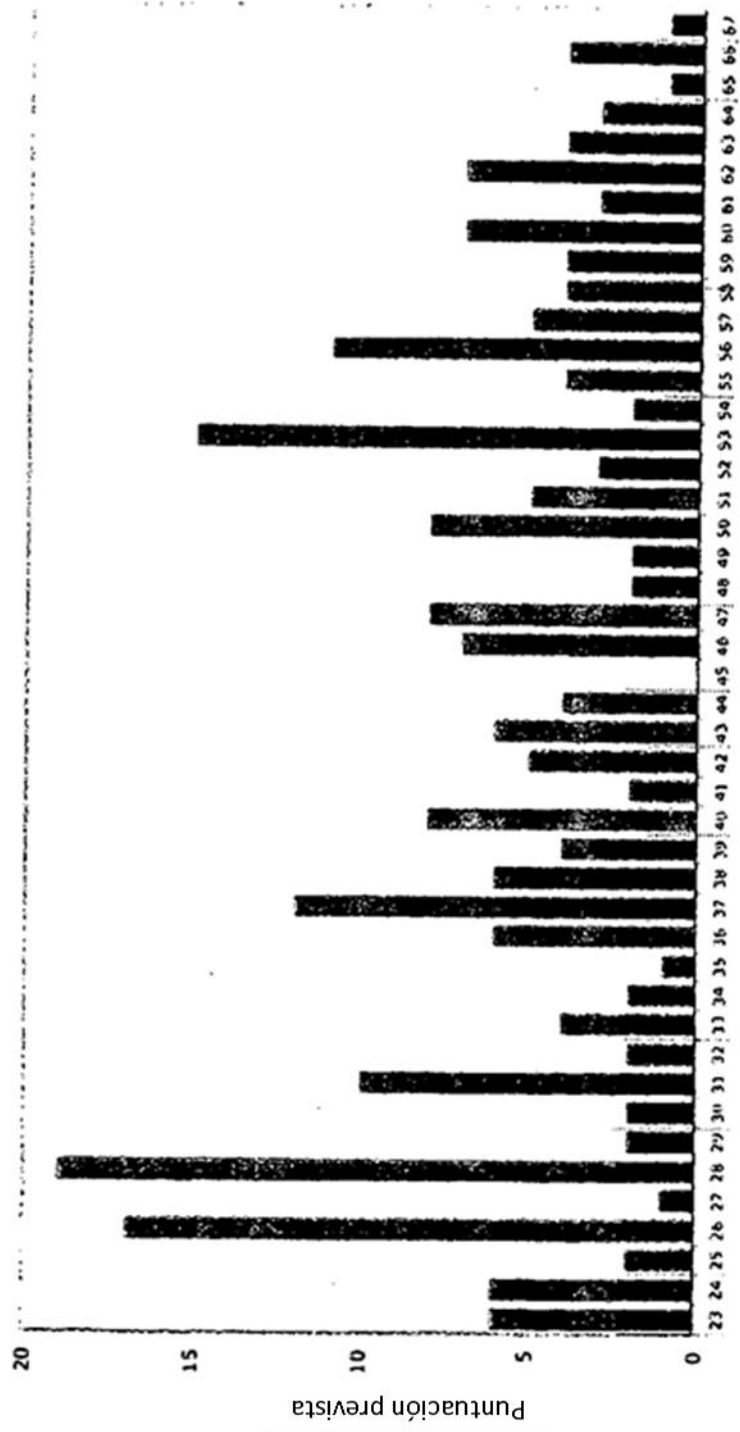


FIGURA 7

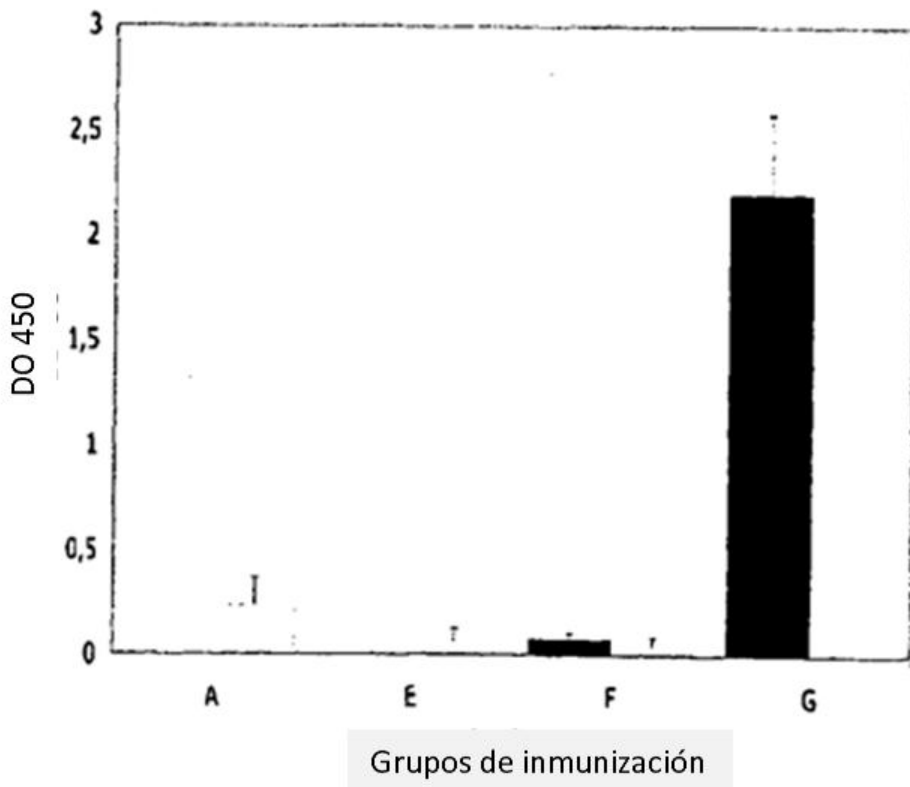
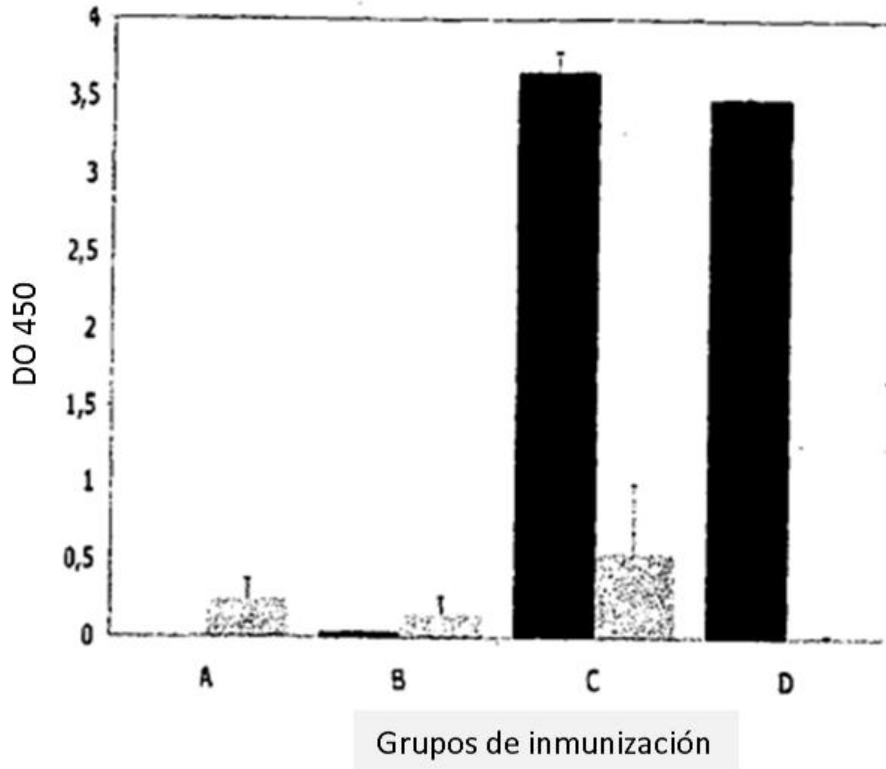
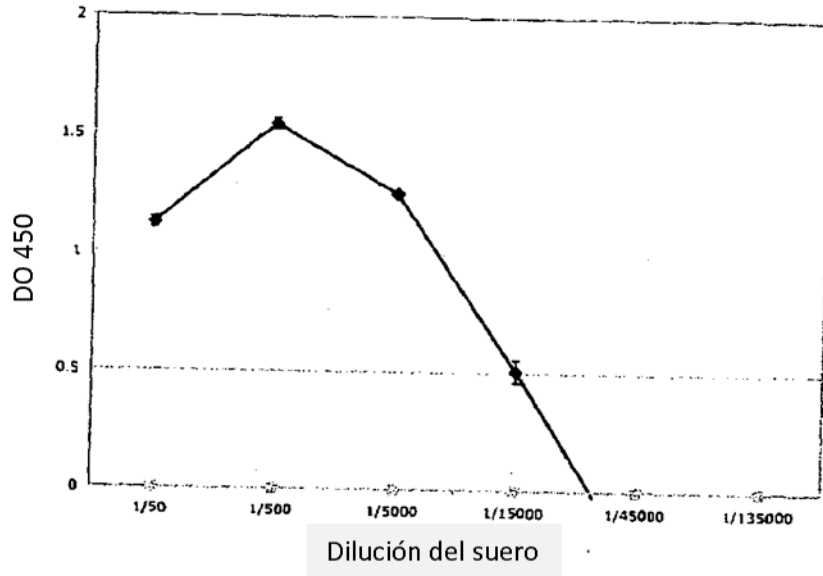




FIGURA 8

A



B

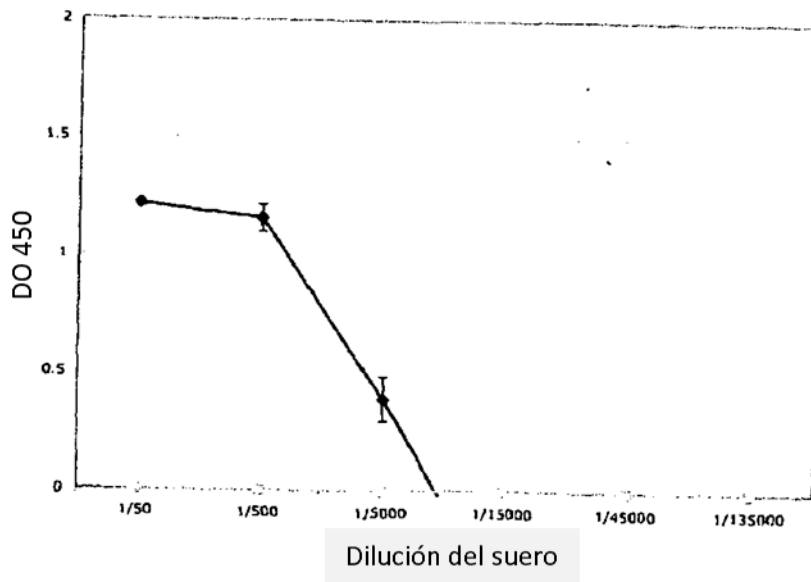


FIGURA 9

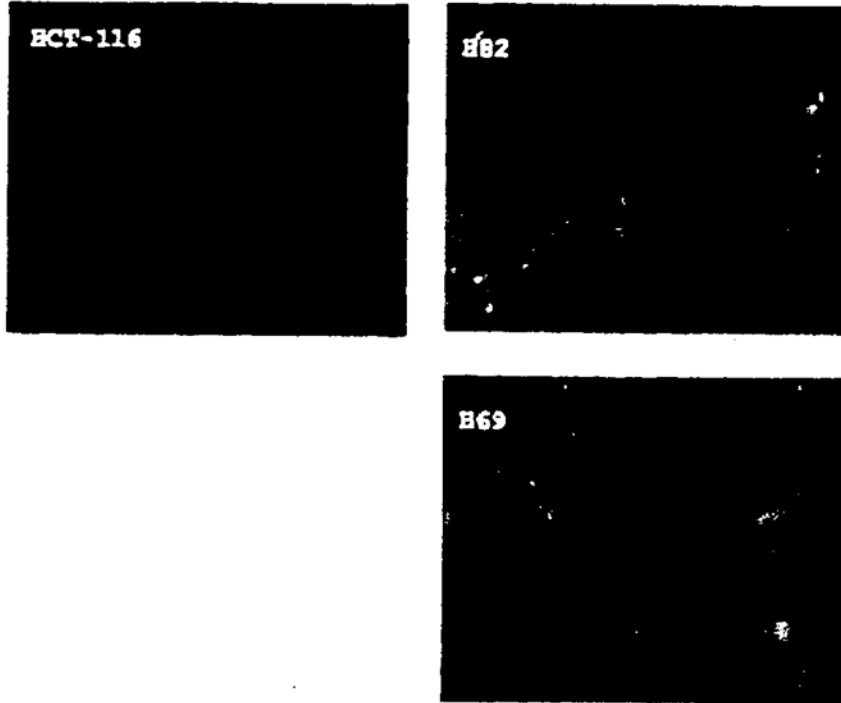


FIGURA 10

